

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie
Direktor: Prof. Dr. med. A. Neubauer
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg

**Herstellung und Charakterisierung mesenchymaler
Stammzellen bei Patienten nach allogener
Blutstammzelltransplantation**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Andreas Dickhut
aus Fulda

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am: 20.10.2005
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.
Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch
Referent: Prof. Dr. med. A. Neubauer
Coreferent: Priv. Doz. Dr. med. T. Zeiler

Abkürzungsverzeichnis

ALCAM	Activated Leucocyte Cell Adhesion Molecule
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
BFGFR	Basic Fibroblast Growth Factor Receptor
CD	Cluster of Differentiation
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
CML	Chronisch myeloische Leukämie
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DNS, DNA	Desoxyribonukleinsäure, Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FSC	Forward Scatter
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
HLA	Humane Leukozytenantigene
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN γ R	Interferon- γ -Receptor
IL-R	Interleukin-Receptor
LFA-3	Lymphocyte Function-Associated Antigen 3
MACS	Magnetic Cell Sorting
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MSC	Mesenchymal Stem Cells
OMF	Osteomyelofibrose
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
RFU	Relative Fluorescence Units
SH	Src Homology
SSC	Side Scatter
STR	Short Tandem Repeats (Synonym: Mikrosatelliten)
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
TGF β R	Transforming Growth Factor β Receptor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule

Abbildungsverzeichnis

1	Berechnung der Spender-/Empfängerkonstellation anhand des Mikrosatellitenprofils	5
2	Darstellung der verschiedenen Differenzierungswege mesenchymaler Stammzellen	6
3	Darstellung des Allelic Ladders aus dem AmpFISTR Profiler Kit	29
4	Zellen aus Leukapheresat nach drei bis fünf Tagen Zellkultur	33
5	Mesenchymale Stammzellen nach drei bis fünf Tagen Zellkultur	34
6	Mesenchymale Stammzellen nach fünf bis zehn Tagen Zellkultur	34
7	Mesenchymale Stammzellen nach zehn bis 15 Tagen Zellkultur	35
8	Mesenchymale Stammzellen nach etwa drei Wochen Zellkultur	35
9	Darstellung von verschiedenen Zelloberflächenmarkern mittels Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)	36
10	Darstellung des β -Interferon-Gens	39
11	Darstellung verschiedener Mikrosatellitenprofile am Beispiel einer eigenen Probe	40
12	Darstellung verschiedener Mikrosatellitenprofile am Beispiel einer Probe aus dem Routinelabor	41

Tabellenverzeichnis

1	Oberflächenmarker, die von mesenchymalen Stammzellen exprimiert werden	7
2	Anzahl der mittels magnetischer Zellsortierung aufgetrennten Zellen	32
3	Konzentration der extrahierten DNS	38
4	Spenderanteil mesenchymaler Stammzellen nach peripherer Blutstammzelltransplantation	42
5	Spenderanteil mesenchymaler Stammzellen nach Knochenmarktransplantation	44

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Konzept der Stammzelle	1
1.2	Blutstammzelltransplantation	1
1.2.1	Knochenmarktransplantation	2
1.2.2	Periphere Blutstammzelltransplantation	3
1.3	Mikrosatellitenanalyse nach Blutstammzelltransplantation	3
1.4	Mesenchymale Stammzellen (MSC)	5
1.4.1	Biologie	5
1.4.2	Medizinische Bedeutung	8
1.4.3	Übertragung bei Blutstammzelltransplantationen	9
1.5	Ziel der Arbeit und Versuchsablauf	10
2	Patienten, Material und Methoden	12
2.1	Material und Geräte	12
2.2	Reagenzien	14
2.2.1	Kulturmedium	14
2.2.2	Chemikalien, Lösungen und Puffer	14
2.2.3	MACS-Antikörper	17
2.3	Leukapheresate	17
2.3.1	Spender	18
2.3.2	Gewinnung	18
2.3.3	Aufbereitung	18
2.3.4	Positivkontrolle	19
2.4	Knochenmarkaspirate	19
2.4.1	Patienten	19
2.4.2	Gewinnung	20
2.5	Dichtegradientenzentrifugation	20
2.6	Magnetische Zellsortierung (MACS)	20
2.7	Zytologie	21
2.7.1	Zellkultur	21
2.7.2	Passagierung	21
2.8	DNS-Extraktion über Silicasäule	22

2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.9.1	Polymerase	23
2.9.2	Primer für die β -Interferon-PCR	24
2.9.3	Primer zur Amplifikation der Mikrosatelliten (STR-PCR)	24
2.9.4	β -Interferon-PCR	26
2.9.5	Amplifikation der Mikrosatelliten (STR-PCR)	27
2.10	Darstellung des β -Interferon-Gens	28
2.11	Mikrosatellitenanalyse	28
2.11.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
2.11.2	Darstellung der Mikrosatelliten-Loci	29
2.11.3	Mikrosatellitenprofile vor Blutstammzelltransplantation	30
2.12	Spenderanteil von hämatopoetischen Zellen	30
3	Ergebnisse	32
3.1	Zytologie	32
3.1.1	Mesenchymale Stammzellen aus Leukapheresat	32
3.1.2	Mesenchymale Stammzellen aus Knochenmarkaspirat	34
3.2	DNS-Extraktion	38
3.2.1	Menge der gewonnenen DNS	38
3.2.2	Darstellung des β -Interferon-Gens	39
3.3	Mikrosatellitenanalyse	39
3.3.1	Spenderanteil nach peripherer Blutstammzelltransplantation	40
3.3.2	Spenderanteil nach Knochenmarktransplantation	43
4	Diskussion	45
5	Zusammenfassung	50
6	Literaturverzeichnis	52
7	Anhang	64
	Curriculum Vitae	64
	Verzeichnis der akademischen Lehrer	66
	Danksagung	67
	Ehrenwörtliche Erklärung	68

1 Einleitung

1.1 Das Konzept der Stammzelle

Als Stammzelle bezeichnet man eine Gewebivorläuferzelle, die sich durch Teilung selbst erhalten und verschiedenartig differenzierte Tochterzellen hervorbringen kann. Dabei unterscheidet sich die pluripotente embryonale Stammzelle, die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen werden kann, von der adulten multipotenten Stammzelle, welche sich als Vorläuferzelle in den meisten Gewebearten ausgewachsener Organismen findet [Jiang et al. 2002]. Die gewebespezifische adulte Stammzelle kommt zum Beispiel als hämatopoetische [Weissman 2000], gastrointestinale [Potten 1998], epidermale [Watt 1998], neuronale [Gage 2000], hepatische [Alison und Sarraf 1998] oder mesenchymale [Caplan 1991, 1994] Stammzelle vor. Im Vergleich zu der embryonalen Stammzelle besitzt die adulte Stammzelle neben dem wahrscheinlich stärker eingeschränkten Differenzierungsvermögen auch eine verminderte Proliferationsfähigkeit [Jiang et al. 2002].

1.2 Blutstammzelltransplantation

Die Blutstammzelle (hämatopoetische Stammzelle) findet sich im Knochenmark des Erwachsenen und stellt die Vorläuferzelle für die korpuskulären Bestandteile und Zellen des peripheren Blutes wie Erythrozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Granulozyten sowie Makrophagen dar [Schiebler 1996]. Die Bedeutung der Blutstammzelle für die klinische Medizin liegt vor allem in der Möglichkeit, durch ihre Transplantation bestimmte Krankheiten zu behandeln. Erkrankungen, zu deren Therapie Blutstammzelltransplantationen durchgeführt werden, sind einerseits angeborene Störungen wie beispielsweise Immundefekte oder die Thalassämia major, andererseits erworbene Defekte wie die aplastische Anämie und verschiedene maligne Erkrankungen des hämatopoetischen Systems [Thomas 1995]. Zu den malignen Erkrankungen zählen insbesondere die chronische myeloische Leukämie, die Osteomyelofibrose, akute Leukämien, Lymphome, myelodysplastische Syndrome und das Plasmozytom (Morbus Kahler). Desweiteren werden Blutstammzellen bei verschiedenen malignen Erkrankungen transplantiert, deren

Behandlung eine starke Knochenmarksuppression zur Folge hat, zum Beispiel Mammakarzinome, Ovarialtumoren oder kleinzellige Bronchialkarzinome [Thomas 1995]. Das Prinzip der Blutstammzelltransplantation besteht in der intravenösen Übertragung der hämatopoetischen Stammzellen, die im Zielorganismus in das Knochenmark einwandern und dessen Blutbildung permanent ersetzen. Sie kann als Knochenmarktransplantation, periphere Blutstammzelltransplantation oder als Plazentarestbluttransplantation (Nabelschnurbluttransplantation) erfolgen [Kolbe und Heimpel 2000]. In der klinischen Medizin sind die beiden erstgenannten Formen am weitesten verbreitet. Sie werden daher in den nachfolgenden Abschnitten 1.2.1 und 1.2.2 kurz beschrieben.

Vor der Transplantation muss am Stammzellempfänger eine Konditionierungstherapie durchgeführt werden, welche vor allem den Zweck verfolgt, das Immunsystem zu supprimieren und es auf diese Weise auf die bevorstehende Transplantation vorzubereiten. Darüber hinaus werden noch vorhandene und potentiell erkrankte Blutstammzellen des Empfängers eliminiert. Die Konditionierung erfolgt durch Zytostatikatherapie in Kombination mit Ganzkörperbestrahlung. Entsprechend der zugeführten Dosis kann sie als volle (myeloablative) oder reduzierte (nicht-myeloablative) Konditionierung erfolgen, wobei die reduzierte Konditionierung vor allem bei älteren Patienten oder Patienten in schlechtem Allgemeinzustand angewandt wird [Georges und Storb 2003].

Je nach Art des Blutstammzellspenders kann die Transplantation autolog, allogene oder syngene erfolgen. Bei der autologen Transplantation werden vor der Konditionierung patienteneigene Blutstammzellen entnommen, um sie danach zu retransplantieren. Allogene Transplantation bedeutet die Übertragung fremder Blutstammzellen, die von HLA-identischen Familienspendern oder Fremdspondern stammen können. Bei der syngenen Transplantation werden immunologisch idente Blutstammzellen eines eineiigen Zwillings übertragen.

1.2.1 Knochenmarktransplantation

Die aus historischer Sicht älteste Art der Blutstammzelltransplantation ist die Knochenmarktransplantation. Der beschriebene Versuch einer intravenösen Infusion von Knochenmark findet sich bereits in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts [Osgood et al. 1939]. Von erfolgreich durchgeführten Knochenmarktransplantationen konnte jedoch erst einige Jahrzehnte später berichtet werden [Thomas et al. 1972, 1977, 1979].

Die Technik der Knochenmarktransplantation besteht in der Entnahme der Blutstammzellen des Spenders durch multiple Aspirationen des Knochenmarks unter allgemeiner Anästhesie.

Anschließend werden die Asparate filtriert und dem Empfänger nach entsprechender Konditionierung intravenös transplantiert [Ostendorf 1991].

1.2.2 Periphere Blutstammzelltransplantation

Im Vergleich zur Knochenmarktransplantation ist die periphere Blutstammzelltransplantation ein verhältnismäßig junges Verfahren zur Substitution hämatopoetischer Stammzellen. Durch die mehrtägige Verabreichung des hämatopoetischen Wachstumsfaktors G-CSF werden Blutstammzellen aus dem Knochenmark des Spenders in den peripheren Blutkreislauf mobilisiert [Sheridan et al. 1992]. Anschließend kann die blutstammzellreiche Fraktion des peripheren Blutes über einen venösen Katheter in einem extrakorporalen System abzentrifugiert (Leukapherese) und dem Empfänger später infundiert werden [Bensinger et al. 1993, Schmitz et al. 1995, 1996].

Unabhängig von der Art der durchgeführten Blutstammzelltransplantation kommt der regelmäßigen Kontrolle des Spenderanteils der hämatopoetischen Zellen im Empfängerorganismus nach Transplantation eine hohe diagnostische und prognostische Bedeutung zu. Zur Detektion des Anteils an Spenderzellen existieren verschiedene Verfahren, so beispielsweise die in-situ-Hybridisierung von X- und Y-Chromosomen [Wessman et al. 1989], der Gebrauch des Restriktionsenzym-Fragmentlängen-Polymorphismus [Yam et al. 1987] oder die Mikrosatellitenanalyse [Ugozzoli et al. 1991, Lawler et al. 1991, Thiede et al. 1999, 2001]. Da die Mikrosatellitenanalyse im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kommt, soll im folgenden Abschnitt 1.3 näher auf diese Methode eingegangen werden.

1.3 Mikrosatellitenanalyse nach Blutstammzelltransplantation

Die Mikrosatellitenanalyse stellt eine sensitive und relativ rasch durchzuführende quantitative Methode zur Bestimmung des Spenderanteils nach einer Blutstammzelltransplantation dar [Ugozzoli et al. 1991, Lawler et al. 1991, Thiede et al. 1999, 2001]. Darüber hinaus bietet sie den Vorteil, nicht von einer verschiedenen geschlechtlichen Spender-/Empfängerkonstellation abhängig zu sein und benötigt zudem nur sehr geringe Mengen Probenmaterials (DNS). Das Verfahren basiert auf der enzymatischen Amplifikation polymorpher Mikrosatelliten (Short Tandem Repeats, STR), welche hochrepetitive DNS-

Sequenzen darstellen. Die für die Amplifikation (STR-PCR) verwendeten Primer sind mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Sie kodieren für insgesamt zehn tetranukleotide Mikrosatelliten-Loci, die jeweils zwischen zwei und 14 Allele aufweisen (siehe Abschnitte 2.9.3 und 2.11.2). Mit dieser Primerauswahl ist gewährleistet, dass nahezu jede denkbare Spender-/Empfängerkonstellation unterschieden werden kann *. Die Primer werden in dieser und ähnlicher Zusammenstellung auch im Bereich der forensischen Medizin verwendet [Holt et al. 2002] und sind kommerziell erhältlich.

Die amplifizierten Mikrosatelliten werden in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, wobei die fluoreszierenden Signale der Primer detektiert werden. Es ergeben sich dadurch individuelle Elektropherogramme (Mikrosatellitenprofile), deren Ausschläge jeweils von der Größe der DNS-Sequenz sowie von der Art und Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes abhängen.

Zur Berechnung der Spender-/Empfängerkonstellation müssen die gewonnenen Mikrosatellitenprofile mit denen des Spenders und des Empfängers vor der Transplantation verglichen werden. Dabei muss vorausgesetzt werden, dass das Verhältnis von Spender-DNS zu Empfänger-DNS dem Mengenverhältnis der Spenderzellen zu den Empfängerzellen entspricht. Desweiteren müssen die Allele der Spender und Empfänger in gleichem Ausmaß amplifiziert werden [Thiede et. al 1999]. Die Berechnung kann dann erfolgen, indem die Größe der Flächen unter den jeweiligen Ausschlägen eines Mikrosatelliten-Locus miteinander verglichen werden (siehe Abbildung 1). Von den verschiedenen Spender-/Empfängerkonstellationen, die anhand der jeweiligen Loci errechnet werden, wird abschließend der Mittelwert gebildet. In entsprechend durchgeführten Verdünnungsreihen [Thiede et. al 1999] zeigte sich, dass der minimale Spenderanteil, der auf diese Weise gerade noch detektiert werden kann, 5 Prozent beträgt. Die Sensitivität der Methode ist somit 95 Prozent.

* Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Individuen ein identisches Mikrosatellitenprofil aufweisen, beträgt $1,23 \times 10^{-10}$ (Angabe der Herstellerfirma, bezogen auf die afrikanische und amerikanische Bevölkerung)

	Spender und Empfänger homozygot A B	Spender und Empfänger heterozygot A B C	Spender heterozygot – Empfänger homozygot A B
Empfänger			
Spender			
Spender- und Empfänger-anteil je 50%			
Berechnung des Spenderanteils (in %)	$= 100 \times \frac{\text{Integral B}}{\text{Integral B} + \text{Integral A}}$	$= 100 \times \frac{\text{Integral C}}{\text{Integral A} - \text{Integral C}}$	$= 100 \times \frac{\text{Integral B}}{(\text{Integral A} - \text{Integral B}) / 2 \times \text{Integral B}}$

Abb. 1: Berechnung der Spender-/Empfängerkonstellation anhand des Mikrosatellitenprofils. Die erste Zeile zeigt die Allele des Empfängers vor der Transplantation, die zweite Zeile die des Spenders und die dritte Zeile zeigt eine Spender-/Empfängerkonstellation von 50%. Je nachdem, ob Spender oder Empfänger in Bezug auf den zu berechnenden Mikrosatelliten-Locus homozygot oder heterozygot sind, erfolgt die Berechnung nach verschiedenen Formeln (untere Zeile).

1.4 Mesenchymale Stammzellen (MSC)

1.4.1 Biologie

Der Begriff der mesenchymalen Stammzelle wurde unter anderem von Caplan geprägt [Caplan 1991]. Er benannte damit eine einzelne Bindegewebsvorläuferzelle, die sowohl Bestandteil des embryonalen als auch adulten Knochenmarkstromas ist und als solche aus beiden isoliert werden kann [Caplan 1991, 1994]. Analog zu dem Konzept der ebenfalls im Knochenmark vorkommenden hämatopoetischen Stammzelle (siehe Abschnitt 1.2) kann die mesenchymale Stammzelle verschiedenen differenzierte Tochterzellen wie Osteozyten, Chondrozyten, Myozyten, Fibrozyten und Adipozyten hervorbringen (siehe Abbildung 2).

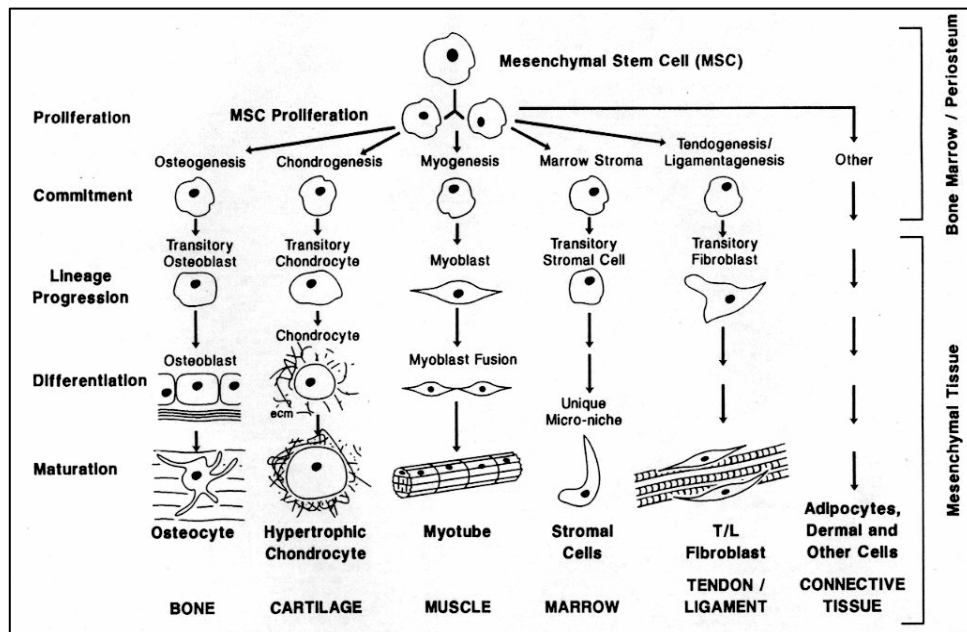


Abb. 2: [aus: Caplan 1994] Darstellung der verschiedenen Differenzierungswege mesenchymaler Stammzellen. Die einzelnen Differenzierungsschritte sind vereinfacht wiedergegeben, was sich vor allem im Bereich der rechten Bildhälfte ausdrückt.

Gestützt werden die Auffassungen Caplans durch zahlreiche Publikationen, welche die verschiedenen Differenzierungsmöglichkeiten menschlicher und tierischer mesenchymaler Stammzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aufzeigen. So konnte neben der Differenzierung in Knochen- und Knorpelgewebe [Cassiede et al. 1996, Kadyala et al. 1997] die Differenzierung zu Adipozyten gezeigt werden [Pittenger et al. 1999, Jaiswal et al. 2000]. Eine Differenzierung in Myozyten [Wakitani et al. 1995, Ferrari et al. 1998], Kardiomyozyten [Toma et al. 2002], viszerale Mesothel [Reyes et al. 2001], Stromazellen des Thymus [Liechty et al. 2000] sowie in Stromazellen des Knochenmarks [Dennis und Caplan 1996, Pittenger et al. 2000] gelang ebenfalls. Letztgenannte Knochenmarkstromazellen bezeichnen hierbei Fibrozyten, welche gemeinsam mit retikulären Fasern das schwammartige Grundgerüst des roten Knochenmarks bilden, in dessen Zwischenräumen die Hämatopoese stattfindet [Schiebler 1996]. Für die Unterscheidung der Knochenmarkstromazelle von der mesenchymalen Stammzelle finden sich zwar auf molekularbiologischer Ebene Hinweise [Majumdar et al. 1998], jedoch ist sie bisher nur über entsprechende Differenzierungsversuche sicher zu treffen.

Eine phänotypische Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen anhand von Zelloberflächenmarkern führte Pittenger durch [Pittenger et al. 1999, Pittenger und Marshak 2001]. Es konnte kein spezifisches Oberflächenmolekül entdeckt werden, welches die

mesenchymale Stammzelle in unverwechselbarer Weise identifiziert. Neben Zytokinrezeptoren wurden Rezeptoren anderer Wachstumsfaktoren sowie extrazelluläre Matrix-Moleküle gefunden (siehe Tabelle 1). Typische Marker hämatopoetischer Zellen (CD14, CD34, CD45) sowie Marker endothelialer Zellen (von-Willebrand-Faktor, P-Selektin) fehlen hingegen.

Tabelle 1: Oberflächenmarker, die von mesenchymalen Stammzellen exprimiert werden.

Typ	Bezeichnung	CD-Nomenklatur
Zytokinrezeptoren	IL-1R	CD121
	IL-3R	CD123
	IL-4R	CD124
	IL-6R	CD126
	IL-7R	CD127
	TNFR	CD120
Wachstumsfaktor-Rezeptoren	BFGFR	-
	PDGFR	CD140
	TGFβR	-
Extrazelluläre Matrix-Rezeptoren	ICAM-1	CD54
	ICAM-2	CD102
	VCAM-1	CD106
	ALCAM	CD166
	LFA-3	CD58
	Endoglin (SH2)	CD105
	Hyaluronsäurerezeptor	CD44
	Integrine:	
	α1, α2	CD49a, CD49b
	α3, αA	CD49c, CD49e
	αV, β1	CD51, CD29
	β3, β4	CD61, CD104
Andere	Ecto-5'-Nucleotidase (SH3)	CD73
	Thy-1	CD90
	IFNγR	CD119

Für den Bereich der klinischen Medizin stellt sich die wichtige Frage, inwieweit mesenchymale Stammzellen zur Behandlung verschiedener Erkrankungen nutzbar gemacht und in den klinischen Alltag eingebunden werden können. Im nächsten Abschnitt 1.4.2 werden verschiedene Arbeiten vorgestellt, die zukünftige potentielle Anwendungsmöglichkeiten der Zellen aufzeigen.

1.4.2 Medizinische Bedeutung

Das in Abschnitt 1.4.1 beschriebene Differenzierungsvermögen der mesenchymalen Stammzelle legt ihre klinische Anwendung vor allem im Bereich der regenerativen Medizin nahe. So induzierten humane mesenchymale Stammzellen, die via Keramikträger in Knochendefekte von immundefizienten Ratten transplantiert wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe intensivere und biomechanisch stabilere Knochenneubildung [Ohgushi et al. 1989, Bruder et al. 1998]. Auch für andere mesenchymale Gewebe konnten im Tiermodell ähnliche Effekte der mesenchymalen Stammzellen auf die Defektheilung gezeigt werden, so zum Beispiel für Gelenkknorpel [Wakitani et al. 1994], Sehngewebe [Young et al. 1998] und Herzmuskulatur [Toma et al. 2002]. Bei Kindern mit Osteogenesis imperfecta führten systemisch infundierte, allogene mesenchymale Stammzellen zu einer Wachstumsverbesserung der geschädigten Knochen [Horwitz et al. 2002]. Andere Arbeiten, in denen mesenchymale Stammzellen erfolgreich autolog [Lazarus et al. 1995, Koc et al. 2000] und allogon [Koc et al. 2002] transplantiert wurden, bestätigen die Möglichkeit einer systemischen Anwendung der Zellen.

Schon längere Zeit ist bekannt, dass Stromazellen des Knochenmarks eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen spielen [Dexter et al. 1977]. Für mesenchymale Stammzellen als Bestandteile des Knochenmarkstromas konnte gezeigt werden, dass sie für die Entwicklung hämatopoetischer Zellen wichtige Zytokine produzieren [Haynesworth et al. 1996, Majumdar et al. 1998, Cheng et al. 2000] und die Expansion hämatopoetischer Vorläuferzellen in vitro unterstützen [Majumdar et al. 2000]. Bei Blutstammzelltransplantationen könnten die Zellen somit für das Engraftment der hämatopoetischen Zellen im Empfänger Knochenmark nach Transplantation von Bedeutung sein [Devine und Hoffman 2000, Koc et al. 2000], zumal die Stromazellen des Empfängers durch die Konditionierungstherapie vor Transplantation nachhaltig geschädigt werden [Galotto et al. 1999]. Verschiedene Arbeiten legen nahe, dass mesenchymale Stammzellen die Lymphozytenfunktion beeinflussen und auf diese Weise bei immunologischen Mechanismen im Rahmen von Blutstammzelltransplantationen bedeutsam sein könnten [Li et al. 2000, Bartholomew et al. 2002, Di Nicola et al. 2002, Rasmusson et al. 2003, Le Blanc et al. 2003, 2004]. Für Blutstammzelltransplantationen sind mesenchymale Stammzellen weiterhin als potentiell tumorfreie [Brendel, C (2005): Publikation in Vorbereitung], differenzierbare Zellreserve von Interesse. Eine Differenzierung zu hämatopoetischen Zellen gelang bereits mit Satellitenzellen des Skelettmuskels [Jackson et al. 1999], neuronalen Stammzellen [Bjornson et al. 1999] sowie mit mesenchymalen Zellen, welche aus dem metanephrogenen Blastem fetaler Nieren gewonnen werden konnten [Almeida-Porada et al. 2002]. Weiterhin konnten im Mausmodell mesenchymale Stammzellen in

Astrozyten [Kopen et al. 1999] und hämatopoetische Stammzellen in Hepatozyten [Lagasse et al. 2000] sowie in Gefäßmuskelzellen [Sata et al. 2002] differenziert werden. Die meisten der genannten Beispiele zeigen Differenzierungen über die Grenzen embryonaler Keimblätter hinaus auf. Diese Beobachtung legt entweder die Schlussfolgerung nahe, dass neben embryonalen Stammzellen auch gewebespezifische, adulte Stammzellen andere Zellen als die der eigenen Gewebeart hervorbringen können (Transdifferenzierung) oder dass sich auch in adultem Gewebe noch sehr frühe Vorläuferzellen befinden, die ähnlich große Differenzierungsmöglichkeiten wie embryonale Stammzellen aufweisen [Lagasse et al. 2000, Jiang et al. 2002]. Vor diesem Hintergrund scheint es plausibel, dass die Herstellung hämatopoetischer Zellen aus adulten mesenchymalen Stammzellen als Derivate des gleichen embryonalen Keimblattes ebenfalls gelingen kann.

1.4.3 Übertragung bei Blutstammzelltransplantationen

Für verschiedene klinische Anwendungsmöglichkeiten mesenchymaler Stammzellen im Zusammenhang mit Erkrankungen des hämatopoetischen Systems ist es zunächst interessant zu klären, ob die Zellen bei allogenen Blutstammzelltransplantationen mit übertragen werden. Die Übertragung dieser Zellen während der Knochenmarktransplantation ist höchst wahrscheinlich, da sie sich verhältnismäßig einfach aus Knochenmarkaspiraten isolieren lassen [Friedenstein et al. 1976, Pittenger et al. 1999]. Eine Isolation mesenchymaler Stammzellen aus Leukapheresaten konnte bisher nicht gezeigt werden [Lazarus et al. 1997]. Dennoch legen verschiedene Arbeiten die Übertragung im Rahmen der peripheren Blutstammzelltransplantation nahe. So fanden sich Hinweise für das Vorkommen einer geringen Anzahl mesenchymaler Stammzellen im peripheren Blut sowohl mit [Kocher et al. 2001, Conrad et al. 2002] als auch ohne vorherige Stimulation durch G-CSF [Zvaifler et al. 2000]. Weiterhin konnten bei einzelnen Patienten nach peripherer Blutstammzelltransplantation mesenchymale Stammzellen des Spenders im Empfänger Knochenmark nachgewiesen werden [Villaron et al. 2004].

In diesem Zusammenhang existieren zu der Frage der dauerhaften Ansiedlung von Knochenmarkstromazellen des Spenders im Knochenmark des Empfängers verschiedene Arbeiten mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen. Im Rahmen der Knochenmarktransplantation konnte Keating die Ansiedlung von Stromazellen des Spenders im Knochenmark des Empfängers zeigen [Keating et al. 1982]. Das Ergebnis wird durch verschiedene andere Arbeiten gestützt [Piersma et al. 1983, Anklesaria et al. 1987, Perkins und Fleischman 1988, Cilloni et al. 2000, Ikpeazu et al. 2000, Villaron et al. 2004]. Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen identifizierte Simmons die Knochenmark-

stromazellen nach Knochenmarktransplantation als Zellen des Empfängers [Simmons et al. 1987]. Auch dieses Ergebnis kann durch andere Arbeiten erhärtet werden [Laver et al. 1987, Agematsu und Nakahori 1991, Koc et al. 1999, Hongeng et al. 2001].

Für systemisch infundierte mesenchymale Stammzellen konnte gezeigt werden, dass sie sich im Knochenmark [Mosca et al. 2000, Devine et al. 2001, Gao et al. 2001] beziehungsweise darüber hinaus im Knochen und in der Haut [Horwitz et al. 2002] des Empfängerorganismus ansiedeln. Andere Arbeiten belegen am Mausmodell, dass Spenderzellen des Knochenmarkstromas nach Knochenmarktransplantation in Verbindung mit einer Knochentransplantation im Thymus des Empfängers [Li et al. 2000] oder nach Infusion von Knochenmark in die Portalvene in der Leber des Empfängers [Kushida et al. 2001] anwachsen.

1.5 Ziel der Arbeit und Versuchsablauf

Ziel der Arbeit

Der vorliegenden Arbeit lag die Hypothese zu Grunde, dass mesenchymale Stammzellen im Rahmen allogener Blutstammzelltransplantationen mit übertragen werden und sich ähnlich wie die transplantierten hämatopoetischen Zellen im Knochenmark des Empfängerorganismus dauerhaft ansiedeln. Aus dieser Hypothese und unter Berücksichtigung der bisherigen Literatur (siehe Abschnitt 1.4.3) lassen sich zwei Hauptfragen der Arbeit ableiten:

1. Werden mesenchymale Stammzellen im Rahmen einer allogenen peripheren Blutstammzelltransplantation mit übertragen und können die Zellen entsprechend aus Leukapheresaten gewonnen werden?
2. Lassen sich im Knochenmark von Empfängern sowohl allogener peripherer Blutstammzelltransplantationen als auch allogener Knochenmarktransplantationen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transplantation mesenchymale Stammzellen des Spenders nachweisen?

Versuchsablauf

Zur Isolation der mesenchymalen Stammzellen aus den Leukapheresaten wurde zuerst eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Bei einem Teil der Proben folgte dann die unmittelbare Kultivierung, ein anderer Teil wurde mit Hilfe der magnetischen Zellsortierung (MACS) weiter aufgetrennt und anschließend kultiviert. Als Positivkontrolle

diente Knochenmark von Spendern nach erfolgter Knochenmarktransplantation. Eine erfolgreiche Anzucht der mesenchymalen Stammzellen sollte deren mögliche Übertragung im Rahmen der peripheren Blutstammzelltransplantation aufzeigen.

Um mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark der Blutstammzellempfänger zu isolieren, wurden Knochenmarkaspirate zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Transplantation bearbeitet. Die Aspirate wurden zunächst mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Anschließend wurde die gewonnene mononukleäre Zellfraktion kultiviert, wobei durch die Wahl der Kulturbedingungen eine Selektion und eine Expansion der mesenchymalen Stammzellen stattfand. Nach ein bis zwei Passagen konnte die genomische DNS aus den Zellen extrahiert werden. Die Darstellung des β -Interferon-Gens erfolgte, um das Ergebnis der DNS-Extraktion zu verdeutlichen. Der Spenderanteil mesenchymaler Stammzellen wurde durch die Mikrosatellitenanalyse bestimmt.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Material und Geräte

Pipetten:

- Einmal-Transferpipetten 3,5 ml der Firma Sarstedt (Nümbrecht)
- Pipetman P der Firma Gilson International (Middleton, USA)
- Pipetus akku der Firma Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
- Research (variabel) der Firma Eppendorf (Hamburg)

Zentrifugen:

- Tischzentrifuge der Firma Qualitron Incorporation (Holland, USA)
- Zentrifuge Typ 5417 R mit Festwinkelrotor der Firma Eppendorf (Hamburg)
- Zentrifuge Typ 5810 R mit Ausschwingrotor der Firma Eppendorf (Hamburg)

Optische Geräte:

- Digitalkamera Typ Coolpix 950 der Firma Nikon (Düsseldorf)
- Lichtmikroskop Typ Labovet der Firma Leitz (Wetzlar)

Zellaufbereitung und Zellkultur:

- CO₂-Inkubator Typ B5060 EC-CO₂ der Firma Heraeus (Hanau)
- Kunststoffschaber der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen)
- Neubauer-Zählkammer 0,0025 mm² der Firma W.Schreck (Hofheim)
- Reinluftgerät Typ HERAsafe HS 12 der Firma Heraeus (Hanau)
- Zellkulturflaschen mit Filter in den Größen 50 ml (25 cm²), 250 ml (75 cm²) und 550 ml (182 cm²) der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen)

Magnetische Zellsortierung (MACS):

- Magnetsäulen vom Typ MS für 10⁷ Zellen pro Säule sowie vom Typ LS für 10⁸ Zellen pro Säule der Firma Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)

DNS-Extraktion und Polymerase-Kettenreaktion (PCR):

- PCR-Gefäße Typ PCR Tubes 0,2 ml der Firma Eppendorf (Hamburg)
- Schüttler Typ Vibrofix VF2 der Firma Janke und Kunkel (Staufen)

- Spektrophotometer: RNA/DNA-Calculator Typ Gene Quant II der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg)
- Thermalcycler Typ Gene Amp PCR System PE 9600 der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems (Weiterstadt)
- Tischwaage Typ 440-45 der Firma Kern&Sohn (Balingen)
- Wärmeblock Typ Blockthermostat BT 100 der Firma Kleinfeld Labortechnik (Gerden)

Gelelektrophorese:

- Abzug der Firma Waldner Laboreinrichtungen (Wangen)
- DNA-Sequencer Typ ABI Prism 377-96 mit Zubehör der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems (Weiterstadt)
- Elektrophoresekammer Typ Horizon 11-14 der Firma Life Technologies (Gathersburg, USA) mit Gelkammern, Stromquelle der Firma Th. Karow (Berlin)
- Magnetrührer mit Heizung Typ MR 2002 der Firma Heidolph Instruments (Schwabach)
- Membranfilter Typ RC 58 (0,2 µm) der Firma Schleicher und Schuell (Dassel)
- Mikrowellengerät Typ Micromat Duo der Firma AEG (Frankfurt/Main)
- Personal Computer Typ Power Macintosh G3 der Firma Apple Computer (Cupertino, USA) mit Software GeneScan 3.1 der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems (Weiterstadt)
- UV-Tisch Typ UV Transilluminator der Firma UVP Incorporation (Upland, USA) mit Photoeinheit der Firma Mitsubishi Electric (Ratingen)
- Wasserstrahlpumpe der Firma Brand (Wertheim)

Sonstige:

- Einmalspritzen 5-50 ml sowie Einmalkanülen Sterican 0,9x70 mm der Firma B.Braun Melsungen (Melsungen)
- Eismaschine Typ AF-10 der Firma Scotsman Ice Systems (Vernon Hills, USA)
- Glaskolben 200-250 ml und Kunststoffgefäße 1,5-50 ml der Firmen Schott (Mainz), Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio-One (Frickenhausen) und Vit-Lab (Seeheim-Jugenheim)
- Kühlsystem: Typ Glass Line der Firma Liebherr-Holding (Biberach)
- Sterilfilter 0,2 µm mit Cellulose-Acetat-Membran der Firma Sartorius (Göttingen)
- Wasseraufbereitungssystem UV/UF Typ Arium 611 der Firma Sartorius (Göttingen)

2.2 Reagenzien

2.2.1 Kulturmedium

Als Kulturmedium für die mesenchymalen Stammzellen diente DMEM Low Glucose 1x mit L-Glutamin der Firma PAA Laboratories (Pasching, Österreich) mit Zusätzen von fötalem Kälberserum der Firma Gibco Invitrogen Corporation (Karlsruhe) sowie Penicillin/Streptomycin der Firma PAA Laboratories (Pasching, Österreich).

Das verwendete fötale Kälberserum war zuvor auf die Erhaltung der in-vitro-Differenzierungsfähigkeit mesenchymaler Stammzellen getestet worden.

<u>Kulturmedium:</u>	500 ml DMEM Low Glucose 1x mit L-Glutamin
	50 ml fötales Kälberserum (im Wasserbad bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert), steril filtriert
	100 IU/ml Penicillin, steril filtriert
	0,1 mg/ml Streptomycin, steril filtriert

2.2.2 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Acrylamidlösung:

- Long Ranger Gel Solution 50% der Firma BioWhittaker Molecular Applications (Rockland, USA)

Agarose:

- Agarose der Firma Life Technologies (Gathersburg, USA)

Ammoniumpersulfatlösung:

- Ammoniumpersulfatlösung 10% bestehend aus zehn Teilen Ammoniumpersulfat der Firma Bio-Rad Laboratories und 90 Teilen Aqua ad injectabilia

Aqua ad injectabilia:

- Aqua ad injectabilia Braun der Firma B.Braun Melsungen (Melsungen)

Dichtegradientenzentrifugationslösungen:

- Ficoll-Paque Plus der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) mit einer Dichte von 1,077+/-0,001 g/ml
- Lymphoprep der Firma Axis-Shield (Oslo, Norwegen) mit einer Dichte von 1,077+/-0,001 g/ml

Die Verwendung der Dichtegradientenzentrifugationslösungen von zwei verschiedenen Herstellern geschah aus Gründen der Labororganisation.

Ethanol Absolut:

- Ethanol Absolut (99,8 Vol.%) der Firma Sigma-Aldrich Laborchemikalien (Seelze)

Ethanol-Desinfektionslösung:

- Ethanol-Desinfektionslösung 70% bestehend aus 70 Teilen Ethanol Absolut und 30 Teilen Aqua ad injectabilia

Ethidiumbromidlösung:

- Ethidiumbromidlösung 1% der Firma Carl Roth (Karlsruhe), Konzentration: 10 mg/ml

Formamid-Ladepuffer:

- Formamid-Ladepuffer bestehend aus 17 Teilen Blue Dextran Loading Buffer der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems (Weiterstadt) und 83 Teilen Formamid entionisiert der Firma Amresco (Solon, USA)

Entsprechende Zusammensetzung: 10 µl Blue Dextran Loading Buffer
50 µl Formamid

Gelladepuffer:

- Gelladepuffer bestehend aus 40 Teilen D-Sucrose und vier Teilen Bromphenolblau/Xylencyanol, beides von der Firma Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) sowie 54 Teilen Aqua ad injectabilia

Entsprechende Zusammensetzung:

1 ml Aqua ad injectabilia
0,4 g Sucrose
50 µl Bromphenolblau/Xylencyanol

Harnstoff:

- Urea der Firma Promega Corporation (Madison, USA)

Isopropanol:

- Isopropanol (2-Propanol) der Firma J.T. Baker (Deventer, Niederlande)

MACS-Puffer:

- PBS-Lösung 1x der Firma Biochrom (Berlin) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} mit Zusatz von bovinem Serumalbumin 30% und EDTA der Firma Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)

Zusammensetzung: 500 ml PBS-Lösung 1x ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}
 10 ml bovines Serumalbumin 30%
 2 ml EDTA 0,5 M

Nusive:

- Nusive CTG Agarose der Firma BioWhittaker Molecular Applications (Rockland, USA)

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung):

- PBS-Lösung 1x der Firma Biochrom (Berlin) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

PCR-Puffer:

- PCR-Puffer 10x der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems (Weiterstadt), enthält 15 mM Magnesiumchlorid

TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer):

- TAE-Puffer 10x der Firma Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen), mit Aqua ad injectabilia auf 1x-Konzentration verdünnt

Entsprechende Zusammensetzung: 0,04 M Tris-Acetat
 0,001 M EDTA

TBE-Puffer (Tris-Borsäure-EDTA-Puffer):

- TBE-Puffer 10x der Firma Invitrogen Corporation (Karlsruhe)

Zusammensetzung: 1,0 M Tris
 0,9 M Borsäure
 0,01 M EDTA

TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer):

- TE-Puffer bestehend aus Tris der Firma Carl Roth (Karlsruhe) und EDTA der Firma Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) in Aqua ad injectabilia

Zusammensetzung: 10 mM Tris
0,1 mM EDTA

TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylenediamin):

- TEMED der Firma Bio-Rad Laboratories (München)

Trypanblau:

- Trypanblaulösung der Firma Biochrom (Berlin) mit 0,5 Teilen Trypanblau in 99,5 Teilen isotoner NaCl-Lösung

Trypsin/EDTA:

- Trypsin/EDTA-Lösung 1x der Firma Hoffmann La Roche, Roche Diagnostics (Mannheim)

2.2.3 MACS-Antikörper

Die Antikörper, welche zur magnetischen Zellsortierung (MACS) benutzt wurden, sind mit Kupferpartikeln markierte Antikörper der Maus. Sie wurden in gebrauchsfertiger Lösung von der Firma Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach) bezogen.

CD45 MicroBeads: monoklonale Mausantikörper des Typs IgG2a gegen humanes CD45-Antigen

2.3 Leukapheresate

Bei den hier verwendeten Leukapheresaten handelte es sich um Restleukapheresat, welches den Rest des jeweils transplantierten Leukapheresates nach abgeschlossener peripherer Blutstammzelltransplantation darstellt. Für die Isolation der mesenchymalen Stammzellen (siehe Abschnitt 2.3.3) wurden somit Schlauch- und Beutelrückstände verwendet, die nach Transplantation des Apheresates als letzter Rest im Beutelsystem verblieben sind und aus technischen Gründen nicht mehr infundiert werden konnten. Die Spender und auch die

Patienten haben in einem allgemeinen Aufklärungsschreiben zur Transplantation der Verwendung von Resten des Transplantates für Forschungszwecke schriftlich zugestimmt. Diese schriftliche Aufklärung und Einverständniserklärung wurde von der Kommission für Ethik in der ärztlichen Forschung des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg gutgeheißen und liegt für jeden Spender beziehungsweise Patienten vor.

2.3.1 Spender

Die Spender der Leukapheresate waren entweder Familienangehörige des Blutstammzellempfängers (verwandte Spender, Familienspender) oder wurden über das Zentrale Knochenmarkspender-Register Deutschland in Ulm ermittelt (unverwandte Spender, Fremdspender).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt neun Leukapheresate bearbeitet, die von vier Familienspendern und fünf Fremdspondern stammen. Die Fremdspender werden in folgenden Spenderdateien geführt: Deutsche Knochenmarkspenderdatei (Tübingen), Aktion Knochenmarkspende Bayern (München), Spenderdatei der Medizinischen Hochschule Hannover.

2.3.2 Gewinnung

Die Gewinnung der Leukapheresate erfolgte bei den Familienspendern in dem Zentrum für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie des Universitätsklinikums der Philipps-Universität Marburg (Leiter: Herr Prof. Dr. med. A. Neubauer). Die Leukapheresate der Fremdspender wurden in dem klinischen Zentrum hergestellt, welches der jeweiligen Spenderdatei, in der die Daten des Spenders geführt werden, zugeordnet ist.

2.3.3 Aufbereitung

Die Aufbereitung der Leukapheresate fand noch am Transplantationstag statt. Beutel und Schlauchsystem wurden mit Ethanol-Desinfektionslösung abgesprüht. Über Punktion des Beutels durch die Silikonmembran sowie durch direkte Punktion des Schlauchsystems wurden die Reste des Beutel- und Schlauchinhaltes unter Spülung mit PBS aspiriert.

Das auf diese Weise gewonnene Zellen-/PBS-Gemisch wurde der Dichtegradientenzentrifugation zugeführt, nach der mit den verschiedenen Proben in unterschiedlicher Weise

verfahren wurde. Vier der Proben wurden vollständig in Zellkultur gegeben. Bei drei der Proben wurde ein Teil der Zellen der magnetischen Zellsortierung zugeführt (siehe Tabelle 2, Abschnitt 3.1.1) und anschließend kultiviert, die übrigen wurden unmittelbar nach Dichtegradientenzentrifugation in Kultur gegeben. Zwei Proben wurden ausschließlich der magnetischen Zellsortierung zugeführt und danach kultiviert.

2.3.4 Positivkontrolle

Als Positivkontrolle diente Knochenmark aus Beuteln nach erfolgter Knochenmarktransplantation, welches dem jeweiligen Empfänger ähnlich wie das Restleukapheresat nach peripherer Blutstammzelltransplantation nicht mehr infundiert werden konnte und in der gleichen wie unter 2.3.3 beschriebenen Weise aufbereitet wurde. Es wurden insgesamt zwei Beutel mit Knochenmark bearbeitet, wobei einerseits die direkte Zellkultur nach Dichtegradientenzentrifugation und andererseits die Kultur nach Dichtegradientenzentrifugation mit anschließender magnetischer Zellsortierung erfolgte. Genau wie bei den Leukapheresaten fand die Bearbeitung der Proben ausschließlich nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Patienten statt.

2.4 Knochenmarkaspirate

2.4.1 Patienten

Es wurden insgesamt 34 Knochenmarkaspirate bearbeitet. Sie stammen von 18 verschiedenen Patienten des Zentrums für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie des Universitätsklinikums der Philipps-Universität Marburg, sowie von sechs verschiedenen Patienten des Zentrums für Knochenmarktransplantation der Stiftung Deutsche Klinik für Diagnostik in Wiesbaden (Leiter: Herr Priv. Doz. Dr. med. R. Schwerdtfeger). Die Proben von letztgenannten Patienten wurden über den Postweg zugestellt. Sie waren bei der Bearbeitung einen Tag alt.

Die Einschlusskriterien zur Teilnahme an der experimentellen Studie waren Einverständnis, Volljährigkeit und Empfang einer allogenen Blutstammzelltransplantation. Ein positives Ethikkommissionsvotum (Aktenzeichen: Studie 65/02) der Kommission für Ethik in der ärztlichen Forschung des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg liegt vor.

2.4.2 Gewinnung

Die Aspirationspunktion zur Gewinnung von Knochenmark wird bevorzugt im Bereich des hinteren Beckenkammes (Spina iliaca posterior superior) durchgeführt [Freund und Queisser 1991]. Alternative Punktionsorte sind der vordere Beckenkamm (Spina iliaca anterior superior) und das Sternum im Bereich des zweiten und dritten Interkostalraumes. Nach Desinfektion der Haut erfolgt eine lokale Anästhesie der Punktionsstelle. Mit der Punktionsnadel wird das Knochenmark anpunktiert und mit Hilfe einer aufgesetzten Spritze kurz und kräftig aspiriert.

2.5 Dichtegradientenzentrifugation

Restleukapheresate und Knochenmarkaspirate wurden mit PBS auf eine bestimmte Menge aufgefüllt, danach wurden zwei Teile des Zellen-/PBS-Gemisches auf einen Teil Dichtegradientenzentrifugationslösung aufgebracht. Nach Zentrifugation (800 g, 30 min, Raumtemperatur, ungebremst) wurde die an der Grenzfläche beider Medien befindliche mononukleäre Zellfraktion abpipettiert. Es folgte mehrfaches Waschen mit PBS, wobei das Zellpellet nach Zentrifugation (300 g, 5 min, Raumtemperatur) jeweils erneut mit PBS aufgefüllt wurde. Die Zellzahl wurde unter gleichzeitiger Vitalitätsprüfung durch Färbung mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.6 Magnetische Zellsortierung (MACS)

Die zu sortierenden Zellen wurden in MACS-Puffer suspendiert, wobei für je 10^7 Zellen 80 μ l Pufferlösung gebraucht wurden. Desweiteren wurden für jeweils 10^7 Zellen 20 μ l der gebrauchsfertigen MicroBeads zugegeben. Nach Inkubation für 15 Minuten bei 6 bis 12°C wurde die Zellsuspension mit MACS-Puffer um den Faktor zehn bis 20 aufgefüllt, zentrifugiert (200 g, 10 min, 6-12°C) und in 500 μ l MACS-Puffer pro 10^8 Zellen resuspendiert. Bei weniger als 10^8 Zellen wurden ebenfalls 500 μ l Puffer verwendet.

Nach Vorspülung der in das Magnetfeld eingebrachten Säulen mit MACS-Puffer (MS: 500 μ l; LS: 3 ml) wurde die Zellsuspension auf die Säulen aufgetragen, wobei die mit Antikörper markierten Zellen in der Säule zurückgehalten wurden, die übrigen Zellen jedoch passieren konnten und im Spülüberstand aufgefangen wurden. Abschließend wurden die

Säulen erneut mit MACS-Puffer gespült (MS: 3x 500 µl; LS: 3x 3 ml). Die bezogen auf den spezifischen Antikörper positive Zellfraktion (CD45+) befand sich in der Säule, die negative Zellfraktion (CD45-) im Spülüberstand. Die CD45-positiven Zellen wurden verworfen, die CD45-negativen Zellen entsprechend des weiteren Versuchsablaufs kultiviert. Der MACS-Puffer wurde bei 4°C gelagert.

2.7 Zytologie

2.7.1 Zellkultur

Die Züchtung der mesenchymalen Stammzellen [Bruder et al. 1997, Pittenger et al. 1999] fand bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre statt. Die Dichte der Zellaussaat war abhängig von der mittels Dichtegradientenzentrifugation und magnetischer Zellsortierung gewonnenen Zellzahl (siehe Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2). Nach Dichtegradientenzentrifugation betrug die Dichte der Aussaat zwischen 5×10^4 und 1×10^6 Zellen pro cm² Flaschenboden. Nach magnetischer Zellsortierung wurden zwischen 4×10^4 und 4×10^5 Zellen pro cm² Flaschenboden kultiviert. Je nach Größe der Zellkulturflaschen wurden 7 ml, 15 ml oder 30 ml des Kulturmediums verwendet.

Um die nicht-adhärenenten Zellen zu entfernen, erfolgte der erste Mediumwechsel 24 Stunden nach Kultivierungsbeginn. Dieser frühe Mediumwechsel diente dazu, das Heranwachsen einer Reinkultur zu begünstigen (siehe Abschnitt 3.1.2 sowie Kapitel 4). Danach wurde das Medium zweimal wöchentlich gewechselt.

2.7.2 Passagierung

Die Passagierung der Zellen erfolgte, sobald sie konfluent gewachsen waren. Die Zellkulturflasche wurde nach Entfernung des alten Kulturmediums mit PBS gespült, um alle Mediumreste abzuwaschen. Nach Zugabe von Trypsin/EDTA und Inkubation bei 37°C für fünf Minuten konnten die gelösten Zellen aus der Zellkulturflasche herauspipettiert werden. Die Menge des dabei verwendeten Trypsin/EDTA war 5 ml, 10 ml oder 15 ml, je nach Größe der Zellkulturflasche. Vor der Resuspendierung der Zellen in der entsprechend größeren Menge des frischen Kulturmediums wurden sie zweimal mit PBS gewaschen, hierbei folgte der Zentrifugation (300 g, 5 min, Raumtemperatur) jeweils das erneute

Auffüllen des Zellpellets mit PBS. Mit jeder Passage wurde die für das Zellwachstum zur Verfügung stehende Fläche des Flaschenbodens verdreifacht.

2.8 DNS-Extraktion über Silicasäule

Die Gewinnung der genomischen DNS aus den kultivierten Zellen fand nach ein bis zwei Passagierungen mit Hilfe eines auf Proteinase K [Ebeling et al. 1974] und Silicasäulen gestützten Verfahrens statt. Es wurde das QIAamp DNA Mini Kit der Firma Quiagen (Hilden) verwendet.

QIAamp DNA Mini Kit:

Proteinase K
Lysepuffer AL
Waschpuffer AW1, AW2
Silicasäulen mit Auffanggefäßen (2 ml)

Die aufzuschlüsselnden Zellen wurden mit dem Kunststoffschaber vom Boden der Zellkulturflasche abgehoben und anschließend abpipettiert, wobei einmal mit PBS nachgespült wurde. Nach Zentrifugation (300 g, 5 min, Raumtemperatur) wurde das Zellpellet mit 200 µl PBS aufgefüllt und sowohl 20 µl Proteinase K als auch 200 µl Lysepuffer AL zugegeben. Der Ansatz wurde 15 Sekunden geschüttelt und für zehn Minuten bei 56°C im Wärmeblock inkubiert. Der Inkubation folgte ein kurzes Anzentrifugieren in der Tischzentrifuge sowie die Zugabe von 200 µl Ethanol Absolut. Nach erneutem Schütteln für 15 Sekunden konnte die Probe in die Silicasäule überführt und diese in ein Auffanggefäß gestellt werden. Es schlossen sich nun zwei Waschschriffe an. Hierzu wurde die Säule zunächst zentrifugiert (6000 g, 1 min, Raumtemperatur), in ein frisches Auffanggefäß eingebracht, mit 500 µl Waschpuffer AW1 aufgefüllt, wieder zentrifugiert (6000 g, 1 min, Raumtemperatur), erneut in ein frisches Auffanggefäß überführt, mit 500 µl Waschpuffer AW2 aufgefüllt und abschließend mit einer Beschleunigung von 20000 g für drei Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Um zu gewährleisten, dass sich keine Ethanolrückstände in der Säule befanden, erfolgte nach den Waschschriffen eine zusätzliche Zentrifugation (20000 g, 1 min, Raumtemperatur) in einem frischen Auffanggefäß. Zur Elution der DNS wurde die Silicasäule in ein 1,5 ml Kunststoffgefäß überführt und mit 150 µl Aqua ad injectabilia aufgefüllt. Nach Inkubation für eine Minute bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (6000 g, 1 min,

Raumtemperatur) befand sich die DNS in Aqua-Lösung im Kunststoffgefäß. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte mittels Extinktionsmessung am Spektrophotometer. Die DNS wurde bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C gelagert.

2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion [Saiki et al. 1985, Mullis et al. 1986] stellt eine enzymatische Amplifikation spezifischer Gensequenzen dar. Sie kann unter Verwendung der Taq DNA Polymerase, welche aus dem stark thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* [Chien et al. 1976] isoliert wird, automatisiert werden.

2.9.1 Polymerase

Für die PCR des β -Interferon-Gens (siehe Abschnitt 2.9.4) wurde die AmpliTaq DNA-Polymerase der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems (Weiterstadt) in einer Konzentration von 5 U/ μ l verwendet. Das Enzym erreicht seine höchste Aktivität in einem Temperaturbereich zwischen 55 und 75°C und besitzt bei 95°C eine Halbwertszeit von 40 Minuten. Als Polymerase für die Amplifikation der Mikrosatelliten (siehe Abschnitt 2.9.5) diente die AmpliTaq Gold DNA-Polymerase (Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt) in einer Konzentration von 5 U/ μ l. Sie wurde im Vergleich zur oben genannten, herkömmlichen AmpliTaq DNA-Polymerase chemisch modifiziert, so dass sie im Temperaturbereich unterhalb der Annealing-Temperatur nahezu vollständig inaktiv ist. Diese Eigenschaft bewirkt, dass ausgehend von Primern, welche sich aufgrund der noch nicht optimalen Temperaturverhältnisse in der Anfangsphase eines Thermalzyklus falsch angelagert haben, nicht polymerisiert wird.

Im Rahmen der Amplifikation der Mikrosatelliten (siehe Abschnitt 2.9.5) verursacht die DNA-Polymerase Artefakte, welche in den Elektropherogrammen als gesonderte Peaks in Erscheinung treten und unter Umständen ihre Beurteilung erschweren. So sind für tetranukleotide Mikrosatelliten sogenannte Stotter-Produkte bekannt, die beispielsweise anhand des vWA-Locus nachgewiesen werden konnten [Walsh et al. 1996]. Indem die DNA-Polymerase das Tetranukleotid am Ende eines DNS-Stranges nicht mehr amplifiziert, ist das Produkt um vier Basenpaare kürzer als das entsprechende Allel und erscheint daher im Elektropherogramm als gesonderter Peak. Die Höhe eines Stotter-Peaks steigt mit der Länge der betroffenen Allele an. Insgesamt schwankt sie zwischen vier und zehn Prozent

der Peak-Höhe des jeweiligen Allels. Die Stotter-Peaks können insbesondere dann Schwierigkeiten in der Auswertung eines nach Transplantation erstellten Mikrosatellitenprofils bereiten, wenn sie an Stellen auftreten, an denen entweder das zugehörige Profil des Empfängers vor der Transplantation oder das Spenderprofil Peaks aufweist (siehe auch Abschnitt 1.3). Ein weiteres Artefakt der DNA-Polymerase entsteht durch die zusätzliche Addition eines Nukleotids, bevorzugt Adenosinmonophosphat, an das 3'-Ende des bereits amplifizierten DNS-Doppelstranges [Clark 1988]. Die durch das angefügte Nukleotid verursachte minimale Größenänderung des DNS-Stranges bewirkt im Elektropherogramm an der Stelle des betroffenen Allels einen zweigeteilten Peak. Der Fehler wird bei dem hier angewendeten Amplifikationsverfahren durch die relativ lang andauernde finale Polymerisation kontrolliert (siehe Abschnitt 2.9.5). Die Anlagerung des artifiziellen Nukleotids erfolgt dadurch an den überwiegenden Teil der bereits amplifizierten DNS-Stränge und wird auf diese Weise im Elektropherogramm verschleiert.

2.9.2 Primer für die β -Interferon-PCR

<u>βIFN 3':</u>	Sequenz: 5'-gCC ACA ggA gCT TCT gAC AC Konzentration: 10 μ M
<u>βIFN 5':</u>	Sequenz: 5'-ggC ACA ACA ggT AgT AggCg Konzentration: 10 μ M

Beide Primer wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin) bezogen.

2.9.3 Primer zur Amplifikation der Mikrosatelliten (STR-PCR)

Die Primer zur Amplifikation der Mikrosatelliten stammen aus dem AmpFISTR Profiler Kit der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems (siehe Abschnitt 2.9.5). Die Gründe für die Wahl der Primer sind bereits in Abschnitt 1.3 dargelegt.

<u>D3S1358:</u>	Chromosomenlokalisierung:	3p
	Sequenz:	TCTA (TCTG) ₁₋₃ (TCTA) _n
	Anzahl der Allele:	8
	Größe der Allele:	114-142 bp
	Fluoreszenzfarbstoff:	5-FAM (blau)

<u>vWA:</u>	Chromosomenlokalisierung:	12p12-pter
	Sequenz:	TCTA (TCTG) ₃₋₄ (TCTA) _n
	Anzahl der Allele:	8
	Größe der Allele:	157-197 bp
	Fluoreszenzfarbstoff:	5-FAM (blau)
<u>FGA:</u>	Chromosomenlokalisierung:	4q28
	Sequenz:	(TTTC) ₃ TTTT TTCT (CTTT) _n CTCC (TTCC) ₂
	Anzahl der Allele:	14
	Größe der Allele:	219-267 bp
	Fluoreszenzfarbstoff:	5-FAM (blau)
<u>Amelogenin:</u>	Chromosomenlokalisierung:	X: p22.1-22.3 ; Y: p11.2
	Sequenz:	—
	Anzahl der Allele:	2
	Größe der Allele:	107 bp, 113 bp
	Fluoreszenzfarbstoff:	JOE (grün)
<u>TH01:</u>	Chromosomenlokalisierung:	11p15.5
	Sequenz:	(AATG) _n
	Anzahl der Allele:	7
	Größe der Allele:	169-189 bp
	Fluoreszenzfarbstoff:	JOE (grün)
<u>TPOX:</u>	Chromosomenlokalisierung:	2p23-2per
	Sequenz:	(AATG) _n
	Anzahl der Allele:	8
	Größe der Allele:	218-242 bp
	Fluoreszenzfarbstoff:	JOE (grün)
<u>CSF1PO:</u>	Chromosomenlokalisierung:	5q33.3-34
	Sequenz:	(AGAT) _n
	Anzahl der Allele:	10
	Größe der Allele:	281-317 bp
	Fluoreszenzfarbstoff:	JOE (grün)

<u>D5S818:</u>	Chromosomenlokalisierung:	5q21-31
	Sequenz:	(AGAT) _n
	Anzahl der Allele:	10
	Größe der Allele:	135-171 bp
	Fluoreszenzfarbstoff:	NED (gelb)
<u>D13S317:</u>	Chromosomenlokalisierung:	13q22-31
	Sequenz:	(GATA) _n
	Anzahl der Allele:	8
	Größe der Allele:	206-234 bp
	Fluoreszenzfarbstoff:	NED (gelb)
<u>D7S820:</u>	Chromosomenlokalisierung:	7q
	Sequenz:	(GATA) _n
	Anzahl der Allele:	10
	Größe der Allele:	258-294 bp
	Fluoreszenzfarbstoff:	NED (gelb)

2.9.4 β -Interferon-PCR

Die zu amplifizierende DNS wurde für 30 bis 60 Minuten bei 60°C im Wärmeblock inkubiert. Zu einem μ l der DNS-Probe wurden dann jeweils 0,5 μ l dNTPs (10 mM) der Firma Gibco Invitrogen (Karlsruhe), 2,5 μ l PCR-Puffer 10x, 0,625 μ l Primer β IFN 3' (10 μ M, siehe Abschnitt 2.9.2), 0,625 μ l Primer β IFN 5' (10 μ M, siehe Abschnitt 2.9.2), 0,125 μ l AmpliTaq DNA-Polymerase (5 U/ μ l, siehe Abschnitt 2.9.1) sowie 19,625 μ l Aqua ad injectabilia zugegeben. Zur Positivkontrolle wurde laborinterne Referenz-DNA eingesetzt, als Negativkontrolle diente Aqua ad injectabilia. Die Pipettierschritte erfolgten auf Eis.

Die Proben wurden im Thermalcycler nach folgendem Schema amplifiziert:

Initiale Denaturierung:	94°C / 2,5 Minuten
Anzahl der Zyklen:	29
➤ Denaturierung:	94°C / 30 Sekunden
➤ Annealing:	55°C / 30 Sekunden
➤ Polymerisation:	72°C / 30 Sekunden
Finale Denaturierung	94°C / 30 Sekunden
Finale Polymerisation:	60°C / 5 Minuten
Haltemodus:	20°C / ∞

2.9.5 Amplifikation der Mikrosatelliten (STR-PCR)

Zur Amplifikation der Mikrosatelliten (siehe auch Abschnitt 1.3) wurde das AmpFlSTR Profiler Kit der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems (Weiterstadt) verwendet.

AmpFlSTR Profiler Kit:

- PCR-Reaktions-Mix (enthält dNTP, Bovines Serum Albumin, MgCl_2 , NaN_3)
- Primer (siehe Abschnitt 2.9.3)
- Kontroll-DNA für PCR
- Amplifizierte Kontroll-DNA für Gelelektrophorese: Allelic Ladder (siehe Abschnitte 2.11.1 und 2.11.2)

Nach Inkubation im Wärmeblock bei 60°C für 30 bis 60 Minuten wurde die zu amplifizierende DNS mit TE-Puffer auf eine Konzentration von 0,1 ng/μl verdünnt. Anschließend erfolgte eine erneute Inkubation im Wärmeblock bei 60°C für 30 bis 60 Minuten. Zu 10 μl der DNA-Verdünnung wurden dann jeweils 10,5 μl des PCR-Reaktions-Mixes, 5,5 μl der Primer-Lösung und 0,5 μl der AmpliTaq Gold DNA-Polymerase (5 U/μl, siehe Abschnitt 2.9.1) gegeben. Als Positivkontrolle diente die Kontroll-DNA, zur Negativkontrolle wurde TE-Puffer verwendet. Die Pipettierschritte erfolgten auf Eis.

Die Proben wurden im Thermalcycler nach folgendem Schema amplifiziert:

Initiale Denaturierung:	95°C / 11 Minuten
Anzahl der Zyklen:	28
➤ Denaturierung:	94°C / 1 Minute
➤ Annealing:	59°C / 1 Minute
➤ Polymerisation:	72°C / 1 Minute
Finale Polymerisation:	60°C / 45 Minuten
Haltemodus:	25°C / ∞

2.10 Darstellung des β -Interferon-Gens

Die Darstellung des β -Interferon-Gens geschah mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese. Zur Herstellung des Agarose-Gels wurden zwei Teile Agarose mit einem Teil Nusive vermischt und 3 g der Mischung in 100 ml TAE-Puffer 1x aufgenommen. Es folgte mehrfaches kurzes Erhitzen im Mikrowellengerät bei 600 Watt, bis die Agarose/Nusive vollständig gelöst war. Nach Zugabe von 10 μ l Ethidiumbromidlösung unter dem Abzug wurde das Gel in die Gelkammer eingebracht und der Kamm (14-zähnig) eingesetzt. Die Polymerisationsdauer betrug etwa eine Stunde, danach konnte das Gel in die mit TAE-Puffer 1x gefüllte Elektrophoresekammer überführt werden, der Kamm wurde entfernt. Zu je 10 μ l des PCR-Produktes (siehe Abschnitt 2.9.4) wurden 4 μ l Gelladepuffer gegeben. Als Größenstandard diente ein 123 bp-Marker der Firma Gibco Invitrogen (Karlsruhe), der vor dem Aufbringen auf das Gel in folgender Weise verdünnt wurde: Zehn Teile des Markers wurden mit 60 Teilen TAE-Puffer 1x und 30 Teilen Gelladepuffer vermischt. In die einzelnen Kammtaschen wurden dann 10 μ l des Probengemisches beziehungsweise des Markers eingebracht. Die Laufzeit betrug eine Stunde bei einer Spannung von 100 Volt.

2.11 Mikrosatellitenanalyse

2.11.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um das Polyacrylamid-Gel herzustellen, wurden 18 g Harnstoff, 5 ml TBE-Puffer 10x, 5 ml Acrylamidlösung und 26,5 ml Aqua ad injectabilia vermischt. Der Ansatz wurde am Magnetrührer bei 37°C solange gerührt, bis der Harnstoff vollständig gelöst war. Nach Filtration über einen Membranfilter (0,2 μ m) sowie Entgasung für fünf Minuten mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe wurden der Gelmischung 250 μ l Ammoniumpersulfatlösung und 35 μ l TEMED zugegeben. Das Gel konnte jetzt in die vorher gereinigten Glasplatten des DNA-Sequenzers eingegossen werden, in denen es innerhalb von etwa zwei Stunden polymerisierte. Im Anschluss an die Polymerisation wurde der Kamm (36-zähnig) in das Gel eingesetzt und die Glasplatten in den DNA-Sequenzer eingebracht. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer (10 Teile TBE-Puffer 10x und 90 Teile Aqua ad injectabilia). In einem Vorlauf wurde das Gel auf 51°C erwärmt.

Je 4 µl des PCR-Produktes (siehe Abschnitt 2.9.5) wurden mit 5 µl des Formamid-Ladepuffers sowie 0,65 µl des fluoreszenzmarkierten Größenstandards GeneScan 350 ROX der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems (Weiterstadt) gemischt. Als Laufstandard dienten 4 µl des Allelic Ladders (siehe Abschnitte 2.9.5 und 2.11.2), denen ebenfalls 5 µl Formamid-Ladepuffer und 0,65 µl GeneScan 350 ROX zugesetzt wurden. Die Pipettierschritte erfolgten auf Eis. Nach Denaturierung im Thermalcycler (95°C, 2 min) wurden je 1,5 µl der Probenlösung in die Kammtaschen des Gels eingebracht.

Laufparameter:	Laufzeit:	Zwei Stunden, 15 Minuten
	Spannung:	3000 V
	Geltemperatur:	51°C

Die Weiterverarbeitung der Primärdaten geschah mit Hilfe der Software GeneScan 3.1.

2.11.2 Darstellung der Mikrosatelliten-Loci

Die bei der Auswertung der Proben (siehe Abschnitt 3.3) analysierten Mikrosatelliten sind in Abbildung 3 dargestellt, die den Allelic Ladder des AmpFISTR Profiler Kit zeigt (siehe Abschnitt 2.9.5). Es sind sämtliche Allele sichtbar, die mit den im Rahmen der STR-PCR verwendeten Primern (siehe Abschnitt 2.9.3) amplifiziert werden können.

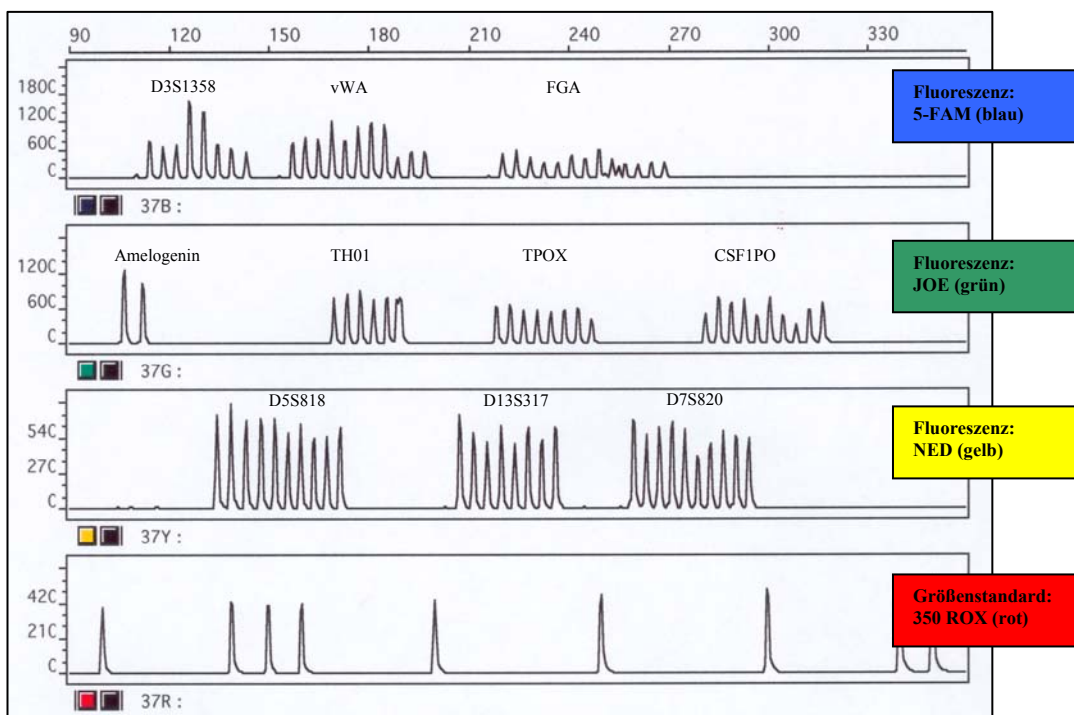


Abb. 3: Legende siehe nächste Seite

Legende zu Abb. 3 (siehe vorige Seite): Darstellung des Allelic Ladders aus dem AmpFISTR Profiler Kit (siehe Abschnitt 2.9.5). Die x-Achse zeigt die Größe der jeweiligen Allele (Basenpaare), die y-Achse gibt die Intensität der Fluoreszenz (Relative Fluorescence Units, RFU) wieder. Bei dem Allelic Ladder handelt es sich um amplifizierte Kontroll-DNA, die als Laufstandard für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient (siehe Abschnitt 2.11.1). Für jeden Mikrosatelliten-Locus enthält der Allelic Ladder sämtliche Allele, die mit den in der STR-PCR verwendeten Primern (Abschnitt 2.9.3) amplifiziert werden können. Jedes Allel tritt dabei als gesonderter Peak in Erscheinung. Die in Bezug auf den jeweiligen Mikrosatelliten-Locus heterozygoten Individuen besitzen je zwei der abgebildeten Allele, die homozygoten Individuen entsprechend jeweils ein Allel. Die Mikrosatelliten-Loci sind von links oben nach rechts unten: D3S1358, vWA, FGA, Amelogenin, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820. Die untere Reihe zeigt den Größenstandard GeneScan 350 ROX.

2.11.3 Mikrosatellitenprofile vor Blutstammzelltransplantation

Zur Auswertung der gewonnenen Ergebnisse wurden die Mikrosatellitenprofile der entsprechenden Patienten vor der Blutstammzelltransplantation sowie die Profile der Stammzellspender herangezogen. Sie stammen für die eigenen Patientenproben aus dem Zentrum für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie des Universitätsklinikums der Philipps-Universität Marburg. Für die Patientenproben des Zentrums für Knochenmarktransplantation der Stiftung Deutsche Klinik für Diagnostik in Wiesbaden wurden sie von Herrn Priv. Doz. Dr. med. C. Thiede aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus an der Technischen Universität Dresden (Leiter: Herr Prof. Dr. med. G. Ehninger) zur Verfügung gestellt. Für Probe Nr. 9 lagen dabei nur Befunde vor, welche mit einem anderen als den für die eigenen Proben verwendeten Größenstandard (siehe Abschnitt 2.11.1) angefertigt wurden. Die exakte Berechnung des Spenderanteils war daher hier nicht möglich (siehe Tabelle 5, Abschnitt 3.3.2).

2.12 Spenderanteil von hämatopoetischen Zellen

Die in der Arbeit ermittelten Ergebnisse zum Spenderanteil mesenchymaler Stammzellen wurden ergänzt, indem ihnen zum jeweils gleichen Zeitpunkt (-13 bis +42 Tage, Median $x_{0,5}$ = 0 Tage) die entsprechenden Befunde zum Spenderanteil hämatopoetischer Zellen gegenübergestellt wurden (siehe Abschnitte 3.3.1 und 3.3.2). Diese stammen für die Patientenproben aus Marburg aus dem Zentrum für Innere Medizin, Schwerpunkt

Hämatologie, Onkologie und Immunologie des Universitätsklinikums der Philipps-Universität Marburg und für die Patientenproben aus Wiesbaden aus dem Zentrum für Knochenmarktransplantation der Stiftung Deutsche Klinik für Diagnostik in Wiesbaden (siehe Abschnitt 2.4.1). Sie wurden entweder aus Knochenmarkaspirat oder peripherem Blut erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Zytologie

3.1.1 Mesenchymale Stammzellen aus Leukapheresat

Mit der Isolation mesenchymaler Stammzellen aus den Leukapheresaten sollte deren Übertragung beim Prozess der allogenen peripheren Blutstammzelltransplantation aufgezeigt werden. Als Isolationsmethoden kamen Dichtegradientenzentrifugation, magnetische Zellsortierung und Zellkultur zur Anwendung (siehe Abschnitt 1.5).

Im Zuge der Dichtegradientenzentrifugation wurde bei sieben der neun aufgearbeiteten Leukapheresate die Zellzahl bestimmt. Sie variierte zwischen $3,2 \times 10^7$ und $1,5 \times 10^9$. Die fünf Probenanteile, die der magnetischen Zellsortierung zugeführt wurden, enthielten zwischen 2×10^7 und 2×10^8 Zellen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Anzahl der mittels magnetischer Zellsortierung aufgetrennten Zellen.

Probenidentifikation	Zellzahl nach Dichtegradienten-zentrifugation	Anzahl der Zellen, die der magnetischen Zellsortierung zugeführt wurden
A	$1,3 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
B	$1,2 \times 10^9$	1×10^8
C	$3,2 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$
D	$8,3 \times 10^7$	2×10^7
E	$1,5 \times 10^9$	2×10^8

Im Rahmen der Zellkultur, die unmittelbar nach der Dichtegradientenzentrifugation angesetzt wurde, fand sich nach drei bis fünf Tagen Kultivierungszeit in vereinzelt Bereichen der Zellkulturflasche ein heterogenes Zellbild. Neben fibrozytenähnlichen Zellen waren auch zahlreiche Zellen erkennbar, die eine lymphozytäre Morphologie aufwiesen (siehe Abbildung 4). Nach vier Wochen weiterer Kultivierung trat keine sichtbare Veränderung von Zellbild und Zellzahl auf.

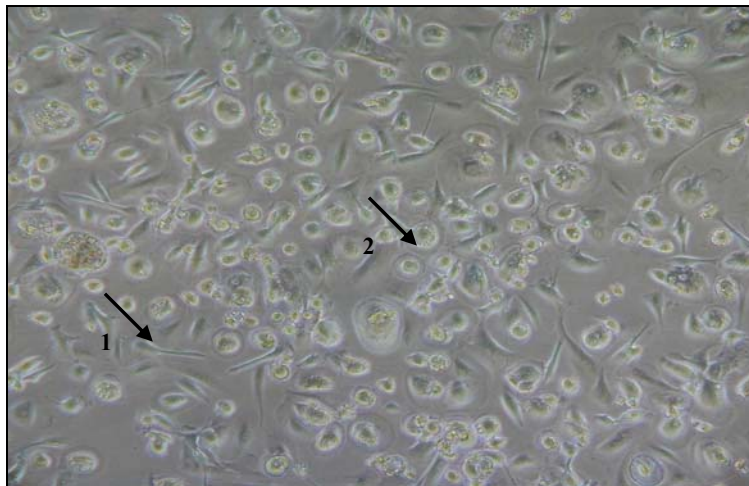


Abb. 4: Zellen aus Leukapheresat nach drei bis fünf Tagen Zellkultur. Neben fibrozytenähnlichen Zellen (1) sind auch zahlreiche Zellen mit lymphozytärer Morphologie (2) zu erkennen.

Die Anzahl der durch magnetische Zellsortierung gewonnenen Zellen betrug ca. 5% der jeweils zugeführten Zellmenge (siehe Tabelle 2). Die Zellen wurden in entsprechender Dichte kultiviert (siehe Abschnitt 2.7.1), wobei nach dem ersten Mediumwechsel (24 Stunden nach Kultivierungsbeginn) nur sehr wenige Zellen in Kultur verblieben, die im weiteren Verlauf nicht anwuchsen und nach mehrfachem Mediumwechsel verschwanden. Als Positivkontrolle diente eine vergleichbare Menge Spenderknochenmark, das nach erfolgter allogener Knochenmarktransplantation ebenfalls aus Beutel und Schlauchsystem gewonnen und unter Verwendung der gleichen Methoden bearbeitet wurde (siehe Abschnitt 2.3.4). Sowohl direkt nach der Dichtegradientenzentrifugation als auch nach der magnetischen Zellsortierung, die der Dichtegradientenzentrifugation folgte, konnten hierbei mesenchymale Stammzellen isoliert werden. Es bildete sich analog zu der im folgenden Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Wachstumskinetik nach etwa drei Wochen ein homogenes, konfluentes Zellbild.

Da sich die mesenchymalen Stammzellen mit den hier verwendeten Methoden nicht zweifelsfrei aus Leukapheresaten isolieren ließen, konnte auch deren Übertragung im Rahmen allogener peripherer Blutstammzelltransplantationen nicht gezeigt werden. Die Isolation der Zellen aus Knochenmarkaspiraten gelang hingegen (siehe oben und Abschnitt 3.1.2). Dies wiederum verdeutlicht, dass die Zellen während einer allogenen Knochenmarktransplantation mit übertragen werden (vergleiche auch Abschnitt 1.4.3).

Im weiteren Verlauf der Studie wurde nun untersucht, ob sich einige Zeit nach der Blutstammzelltransplantation mesenchymale Stammzellen des Spenders im Knochenmark des Empfängers detektieren lassen. Hierzu wurden Knochenmarkaspirate von Empfängern zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation bearbeitet (siehe Abschnitt 3.1.2).

3.1.2 Mesenchymale Stammzellen aus Knochenmarkaspirat

Bei sieben der insgesamt 34 bearbeiteten Proben wuchsen die mesenchymalen Stammzellen nicht an; alle sieben Proben stammten aus dem Universitätsklinikum der Philipps-Universität Marburg (siehe Abschnitt 2.4.1). An drei der sieben Proben wurde während der Dichtegradientenzentrifugation die Zahl der isolierten Zellen ermittelt. Die Anzahl betrug $2,1 \times 10^6$, $1,9 \times 10^6$ und $9,3 \times 10^6$ Zellen. Von den 27 erfolgreich angezüchteten Proben wurden 19 Probenteile ausgezählt. Hier streuten die Zellzahlen zwischen $3,5 \times 10^6$ und $2,8 \times 10^8$. Nach der Dichtegradientenzentrifugation wurden die mononukleären Zellen in Kultur gegeben und nach drei bis fünf Tagen konnten vereinzelte mesenchymale Stammzellen unter dem Mikroskop beobachtet werden (siehe Abbildung 5). Die Zellen waren nach etwa drei Wochen homogen und konfluent gewachsen (siehe Abbildungen 6 bis 8). Sie wurden nach ein bis zwei Passagierungen der DNS-Extraktion zugeführt (siehe Abschnitt 3.2).

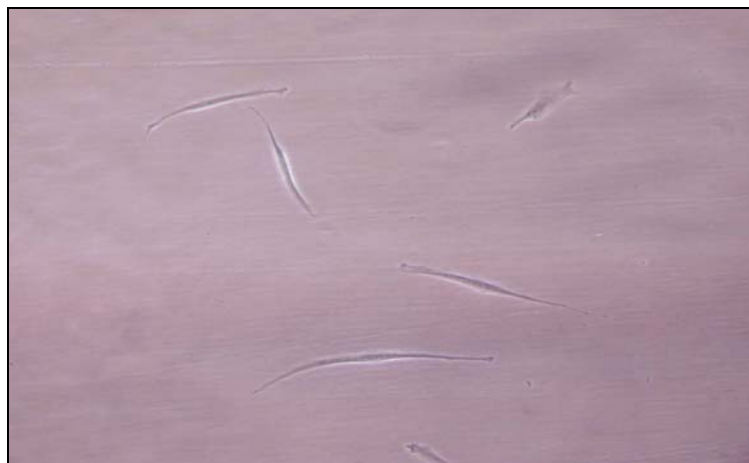


Abb. 5: Mesenchymale Stammzellen nach drei bis fünf Tagen Zellkultur.



Abb. 6: Mesenchymale Stammzellen nach fünf bis zehn Tagen Zellkultur.

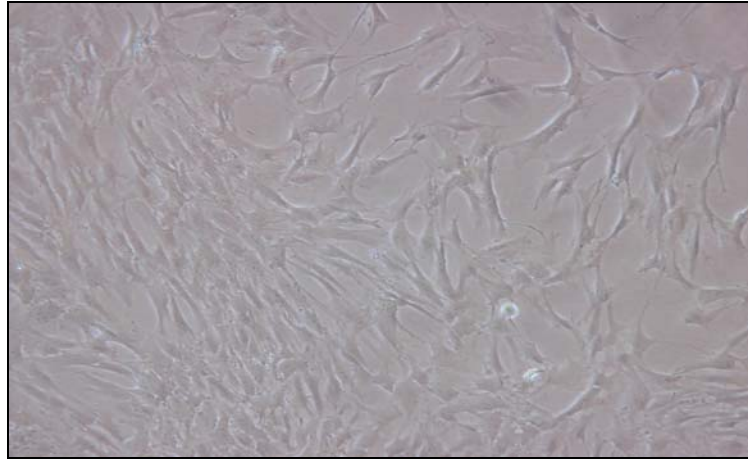


Abb. 7: Mesenchymale Stammzellen nach zehn bis 15 Tagen Zellkultur.

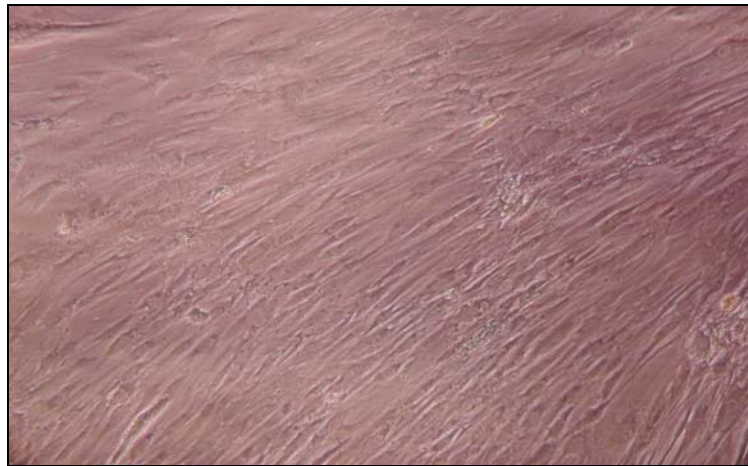


Abb. 8: Mesenchymale Stammzellen nach etwa drei Wochen Zellkultur.

Bezüglich Proliferation und Wachstum war zwischen den aus dem Universitätsklinikum der Philipps-Universität Marburg und den aus der Stiftung Deutsche Klinik für Diagnostik in Wiesbaden stammenden Zellen kein Unterschied zu beobachten (siehe Abschnitt 2.4.1). Bei Probe Nr. 2 fand nach anfänglichem Auftreten einzelner mesenchymaler Stammzellen in der Kultur kein Zellwachstum mehr statt. Im weiteren Verlauf wurde daher aus entsprechend wenigen Zellen die DNS extrahiert (siehe Abschnitt 3.2).

Der Reinheitsgrad der isolierten und angezüchteten Zellen wurde in der eigenen Arbeitsgruppe [Brendel et al. 2005] durch die Darstellung verschiedener Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie bestimmt (siehe Abbildung 9). Dabei zeigte sich, dass die Zellen für die Marker CD105, CD44 und CD90 homogen positiv sowie für die Marker CD34, CD45, CD14 und CD31 homogen negativ sind und somit den Charakteristika mesenchymaler Stammzellen entsprechen (siehe Abschnitt 1.4.1). Die Gewinnung der auf

diese Weise charakterisierten Zellen erfolgte mit den gleichen Isolations- und Kultivierungsmethoden, die auch in der vorliegenden Arbeit angewandt wurden.

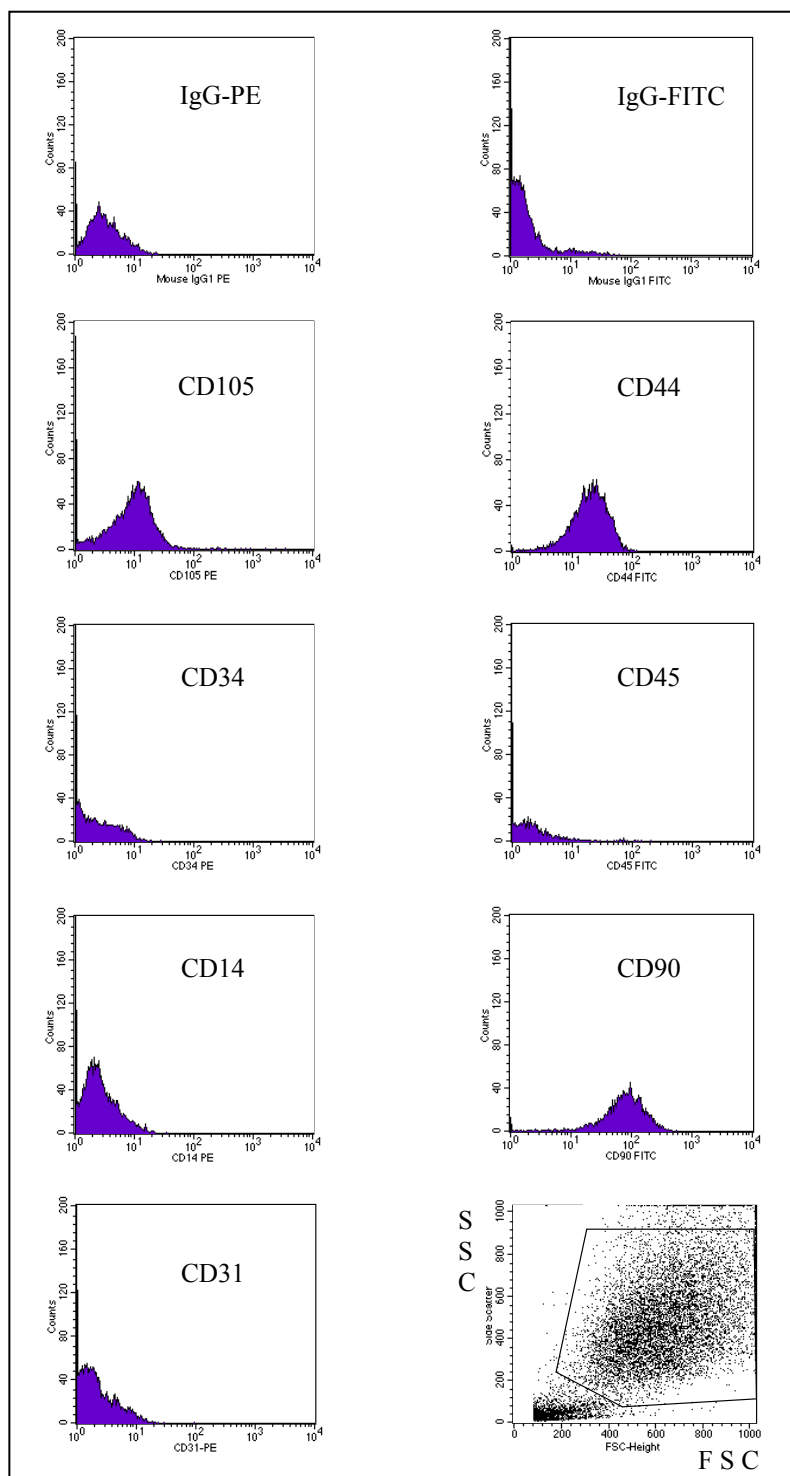


Abb. 9: Legende siehe nächste Seite

Legende zu Abb. 9 (siehe vorige Seite): [aus: Brendel et al. 2005] Darstellung von verschiedenen Zelloberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse). Die Abbildungen zeigen, dass die Zellen für die Marker CD105, CD44 und CD90 homogen positiv und für die Marker CD34, CD45, CD14 und CD31 homogen negativ sind. In der Abbildung rechts unten stehen sich Zellgröße (FSC) und Granulation (SSC) gegenüber, anhand deren Verhältnis das Analysefenster eingerichtet wird. Die beiden Abbildungen der oberen Reihe stellen die Isotypkontrollen für die jeweils verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe dar. Die Gewinnung der charakterisierten Zellen erfolgte mit den gleichen Isolationsmethoden, die in der vorliegenden Arbeit angewandt wurden.

3.2 DNS-Extraktion

3.2.1 Menge der gewonnenen DNS

Nach erfolgreicher Anzucht der mesenchymalen Stammzellen (siehe Abschnitt 3.1.2) wurde aus den Zellen die genomische DNS extrahiert. Die bei den verschiedenen Proben gewonnene Menge an DNS ist in Tabelle 3 aufgelistet. Die Konzentrationsangabe bezieht sich auf jeweils 150 ml DNS-Lösung, die bei jeder Probe eluiert wurde (siehe Abschnitt 2.8).

Tabelle 3: Konzentration der extrahierten DNS. Proben mit gleicher Anfangsziffer stammen von demselben Patienten.

Probenidentifikation	DNS-Konzentration in µg/ml
1.1	66,5
1.2	152,1
2	0,8
3	119,1
4	44,2
5	329,3
6.1	79,7
6.2	317,1
6.3	62,4
7.1	217,3
7.2	237,2
7.3	54,1
8	199,1
9	45,5
10	115,0
11	71,5
12	150,0
13	94,5
14	527,1
15	130,1
16	176,1
17	68,3
18	231,4
19	104,1
20.1	158,7
20.2	410,4
21	20,1

3.2.2 Darstellung des β -Interferon-Gens

Um das Ergebnis der DNS-Extraktion zu verdeutlichen, wurde bei den verschiedenen Proben das PCR-Produkt aus dem β -Interferon-Gen dargestellt. Dies gelang bei allen Proben mit Ausnahme der Probe Nr. 2, bei der nur sehr wenig DNS gewonnen werden konnte (siehe Abschnitte 3.1.2 und 3.2.1). Die folgende Abbildung 10 zeigt eine exemplarische Auswahl von PCR-Produkten nach Gelelektrophorese. Alle durchgeführten Positiv- und Negativkontrollen waren stets unauffällig.

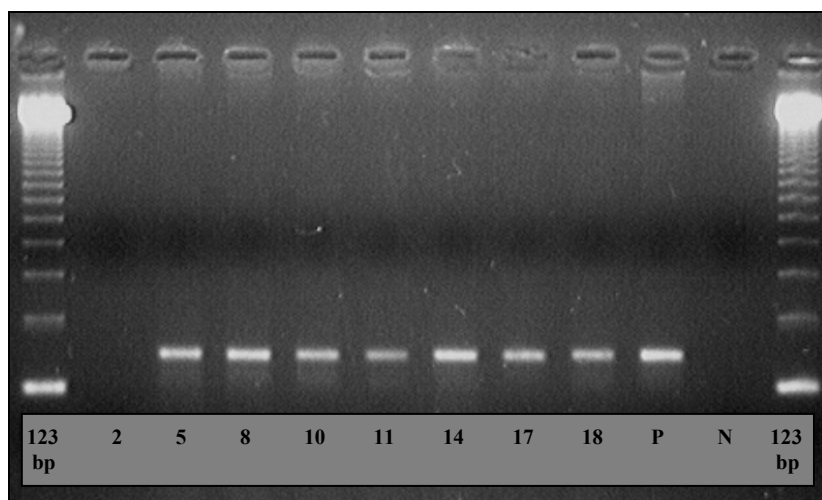


Abb. 10: Darstellung des β -Interferon-Gens. Sichtbar sind die 170 Basenpaare umfassenden Produkte der PCR aus dem β -Interferon-Gen nach Aufnahme des mittels Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels unter Bestrahlung mit UV-Licht. Probenidentifikation von links nach rechts: 123 bp-Marker, 2, 5, 8, 10, 11, 14, 17, 18, Positivkontrolle, Negativkontrolle, 123 bp-Marker. Entsprechend der jeweiligen DNS-Konzentration stellen sich die Banden in unterschiedlicher Ausprägung dar.

3.3 Mikrosatellitenanalyse

Aus der gewonnenen DNS wurde durch Mikrosatellitenanalyse der jeweilige Spenderanteil mesenchymaler Stammzellen ermittelt (siehe Abschnitt 1.3). Bei der durchgeführten Amplifikation der Mikrosatelliten (siehe Abschnitt 2.9.5) traten während der Aufarbeitung im Labor keine Kontaminationen der zu amplifizierenden DNS auf. Die bei den untersuchten Proben durchgeführten Negativkontrollen blieben stets negativ. Darüber hinaus waren die Positivkontrollen stets positiv.

3.3.1 Spenderanteil nach peripherer Blutstammzelltransplantation

Die folgende Abbildung 11 zeigt eine exemplarische Auswahl verschiedener Mikrosatellitenprofile von Probe Nr. 13 (siehe Tabelle 4). Es wird deutlich, dass das von den mesenchymalen Stammzellen gewonnene Profil mit dem Profil des Empfängers vor Transplantation vollständig übereinstimmt, während die Blutzellen des Empfängers zum gleichen Zeitpunkt ein Spenderprofil aufweisen. Der Spenderanteil mesenchymaler Stammzellen nach Transplantation beträgt bei dieser Probe null Prozent (siehe Abschnitt 1.3). Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 12 die Mikrosatellitenprofile einer zufällig ausgewählten Probe aus dem Routinelabor des Zentrums für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie des Universitätsklinikums der Philipps-Universität Marburg. Im Profil des Empfängers nach Transplantation sind sowohl spezifische Peaks des Empfängers vor Transplantation als auch spezifische Spender-Peaks sichtbar. Es errechnet sich ein Spenderanteil hämatopoetischer Zellen von nahezu 50 Prozent.

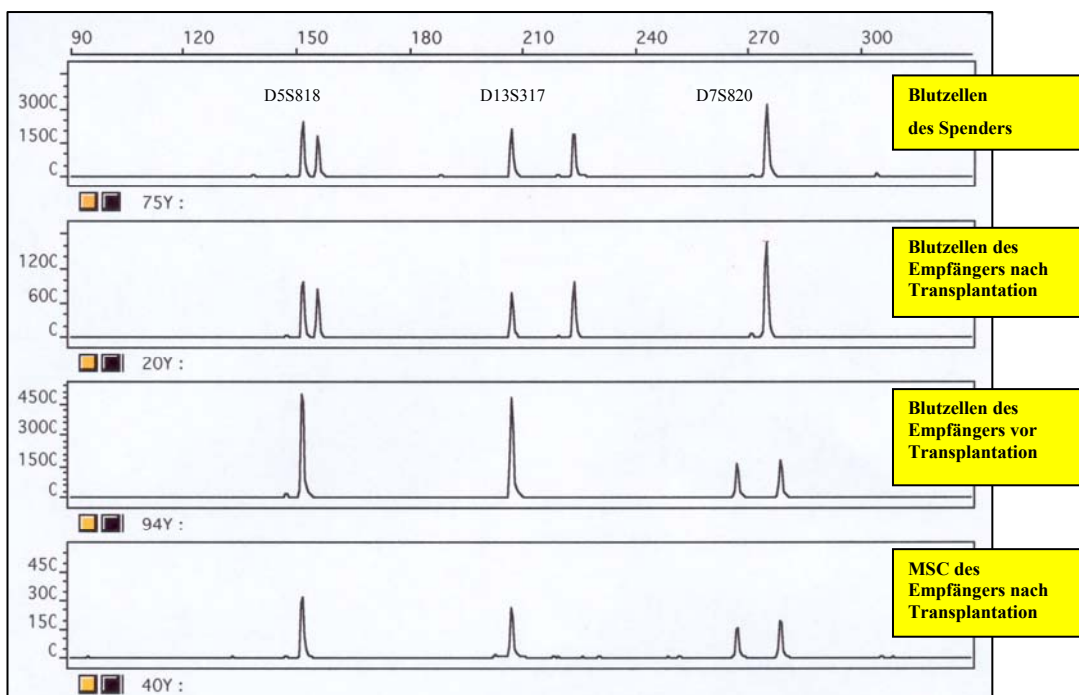


Abb. 11: Darstellung verschiedener Mikrosatellitenprofile am Beispiel von Probe Nr. 13 (siehe Tabelle 4). Die x-Achse zeigt die Größe der jeweiligen Allele (Basenpaare), die y-Achse gibt die Intensität der Fluoreszenz (Relative Fluorescence Units, RFU) wieder. Dargestellt sind die Mikrosatelliten-Loci D5S818, D13S317 und D7S820. Das Profil der mesenchymalen Stammzellen (MSC) des Empfängers wurde 77 Tage nach der peripheren Blutstammzelltransplantation erstellt. Es stimmt mit dem Empfängerprofil vor der Transplantation vollständig überein, während die Blutzellen des Empfängers zum gleichen Zeitpunkt ein Spenderprofil aufweisen. Dies ist besonders gut sichtbar an den Allelen des Locus D7S820 (vergleiche auch Abbildung 12).

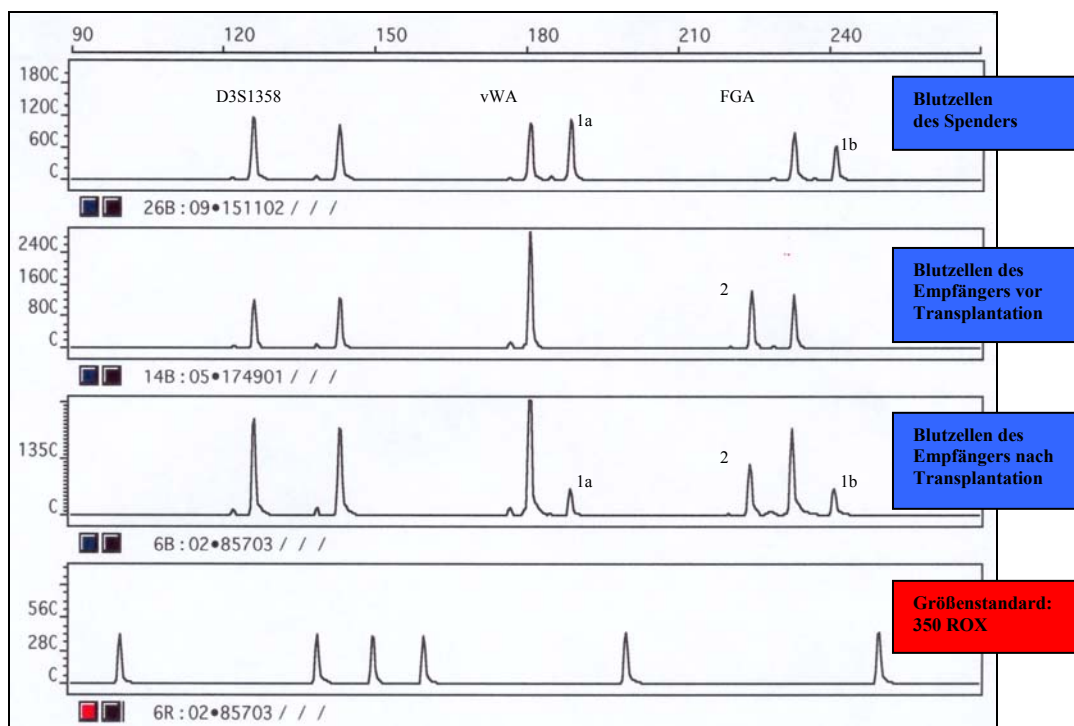


Abb. 12: Darstellung verschiedener Mikrosatellitenprofile am Beispiel einer Probe aus dem Routinelabor des Zentrums für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie des Universitätsklinikums der Philipps-Universität Marburg. Die x-Achse zeigt die Größe der jeweiligen Allele (Basenpaare), die y-Achse gibt die Intensität der Fluoreszenz (Relative Fluorescence Units, RFU) wieder. Dargestellt sind die Mikrosatelliten-Loci D3S1358, vWA und FGA. Anhand der Allele von FGA und vWA wird deutlich, dass der Empfänger nach der Blutstammzelltransplantation (+1634 Tage) sowohl spezifische Peaks des Spenderprofils (1a und 1b) als auch solche des Empfängerprofils vor der Transplantation (2) aufweist. Bei dieser Probe errechnet sich unter Berücksichtigung aller auswertbaren Allele ein Spenderanteil hämatopoetischer Zellen von nahezu 50 Prozent (siehe Abschnitt 1.3).

Insgesamt stammen 18 der 27 ausgewerteten Knochenmarkproben von Empfängern peripherer Blutstammzelltransplantationen. Bei allen 18 Proben stimmten, wie anhand von Probe Nr. 13 bereits verdeutlicht, die Mikrosatellitenprofile mesenchymaler Stammzellen nach Transplantation mit denen der Empfänger vor Transplantation vollständig überein. Bei zwei der Proben zeigten sich zusätzlich spezifische Peaks der entsprechenden Spenderprofile, die jedoch nur minimal ausgeprägt waren (siehe Probe Nr. 2 und 10, Tabelle 4). Unter Berücksichtigung der Sensitivität der Methode (siehe Abschnitt 1.3) bedeutet dies, dass zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation keine mesenchymalen Stammzellen des Spenders im Knochenmark des Empfängers nachweisbar waren. Dagegen schwankte der Spenderanteil hämatopoetischer Zellen zum jeweils

gleichen Zeitpunkt zwischen 70 und 100 Prozent, Median $x_{0,5} = 100$ (siehe Abschnitt 2.12). Eine Übersicht über die gesamten Daten gibt Tabelle 4.

Tabelle 4: Spenderanteil mesenchymaler Stammzellen (MSC) nach peripherer Blutstammzelltransplantation. Proben mit gleicher Anfangsziffer stammen von demselben Patienten.

Hinsichtlich der Art der Konditionierung bedeutet die volle Konditionierung entweder eine Ganzkörperbestrahlung (12 Gray) kombiniert mit der zweimaligen Gabe von Cyclophosphamid (60 mg/kg Körpergewicht) oder eine Gabe von Busulfan (16 mg/kg Körpergewicht) ebenfalls in Kombination mit der zweimaligen Gabe von Cyclophosphamid (60 mg/kg Körpergewicht). Jede niedrigere Dosierung der Bestrahlung und/oder der Zytostatikatherapie entspricht einer reduzierten Konditionierung.

Proben- identifikation	Alter (Jahre)	Geschlecht	Krankheits- diagnose	Zeit nach Trans- plantation (Tage)	Art der Konditionierung	Spender- anteil Blutzellen (Prozent)	Spender- anteil MSC (Prozent)
1.1	45	m	AML	962	reduziert	-	0
1.2	46	m	AML	1334	reduziert	100	0
2	41	w	AML	616	reduziert	87,0	1,5
3	31	m	Non- Hodgkin Lymphom	66	reduziert	100	0
5	38	m	AML	362	reduziert	100	0
6.1	32	m	ALL	151	voll	99,0	0
6.2	32	m	ALL	225	voll	100	0
6.3	32	m	ALL	259	voll	98,0	0
7.1	43	m	AML	144	reduziert	100	0
7.2	43	m	AML	263	reduziert	99,0	0
7.3	44	m	AML	480	reduziert	-	0

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 4

Proben- identifikation	Alter (Jahre)	Geschlecht	Krankheits- diagnose	Zeit nach Trans- plantation (Tage)	Art der Konditionierung	Spender- anteil Blutzellen (Prozent)	Spender- anteil MSC (Prozent)
10	40	w	AML	533	reduziert	70,0	1,8
13	42	w	ALL	77	voll	100	0
17	33	m	ALL	82	voll	-	0
19	31	m	ALL	53	voll	100	0
20.1	39	w	MDS	25	reduziert	100	0
20.2	39	w	MDS	34	reduziert	100	0
21	36	m	Non- Hodgkin Lymphom	83	reduziert	96,0	0

3.3.2 Spenderanteil nach Knochenmarktransplantation

Von den 27 bearbeiteten Proben stammen neun von Patienten nach Knochenmarktransplantation. Genau wie bei den Befunden der Patienten nach peripherer Blutstammzelltransplantation (siehe Abschnitt 3.3.1) fand sich bei den erstellten Mikrosatellitenprofilen eine vollständige Übereinstimmung mit den entsprechenden Profilen des Empfängers vor der Transplantation und sie enthielten desweiteren keine spezifischen Ausschläge der Profile des jeweiligen Knochenmarkspenders. Demzufolge ließen sich auch einige Zeit nach Knochenmarktransplantation keine mesenchymalen Stammzellen des Spenders im Knochenmark des Empfängers nachweisen. Zum Zeitpunkt der entsprechenden Probenentnahme betrug der Spenderanteil hämatopoetischer Zellen zwischen 92,2 und 100 Prozent, Median $x_{0,5} = 98,2$ (siehe Abschnitt 2.12). In Tabelle 5 sind die wichtigsten Daten zusammengefasst.

Tabelle 5: Spenderanteil mesenchymaler Stammzellen (MSC) nach Knochenmarktransplantation. Hinsichtlich der Art der Konditionierung bedeutet die volle Konditionierung entweder eine Ganzkörperbestrahlung (12 Gray) kombiniert mit der zweimaligen Gabe von Cyclophosphamid (60 mg/kg Körpergewicht) oder eine Gabe von Busulfan (16 mg/kg Körpergewicht) ebenfalls in Kombination mit der zweimaligen Gabe von Cyclophosphamid (60 mg/kg Körpergewicht). Jede niedrigere Dosierung der Bestrahlung und/oder der Zytostatikatherapie entspricht einer reduzierten Konditionierung.

Proben- identifikation	Alter (Jahre)	Geschlecht	Krankheits- diagnose	Zeit nach Trans- plantation (Tage)	Art der Konditionierung	Spender- anteil Blutzellen (Prozent)	Spender- anteil MSC (Prozent)
4	21	m	ALL	40	voll	100	0
8	59	m	Morbus Kahler	921	reduziert	100	0
9	42	m	CML	300	voll	97,1	<5 *
11	45	w	AML	90	voll	97,4	0
12	42	m	MDS	223	voll	97,0	0
14	23	m	CML	315	voll	92,2	0
15	50	m	OMF	345	voll	99,2	0
16	42	M	ALL	169	voll	100	0
18	57	w	Morbus Kahler	173	reduziert	98,2	0

* Aus methodischen Gründen war hier die exakte Berechnung nicht möglich (siehe Abschnitt 2.11.3)

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Beantwortung der Frage, ob mesenchymale Stammzellen im Rahmen einer allogenen Blutstammzelltransplantation mit übertragen werden und inwieweit sich die Zellen nach der Transplantation im Knochenmark des Empfängers nachweisen lassen (siehe Abschnitt 1.5).

Die Übertragung mesenchymaler Stammzellen während einer Knochenmarktransplantation wird, wie in bereits veröffentlichten Arbeiten [Friedenstein et al. 1976, Pittenger et al. 1999] und auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit (siehe Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2) gezeigt, durch die erfolgreiche Isolation der Zellen aus Knochenmarkaspiraten beziehungsweise aus Knochenmarktransplantaten verdeutlicht. Um die Übertragung mesenchymaler Stammzellen bei der peripheren Blutstammzelltransplantation aufzuzeigen, wurde die Isolation und Anzüchtung der Zellen aus Leukapheresaten versucht (siehe Abschnitt 3.1.1). Dies gelang jedoch nicht. Dabei kam zusätzlich zu der Isolationsmethode, die auch für die Knochenmarkaspirate verwendet wurde, eine Anreicherung der Zellen mittels magnetischer Zellsortierung zur Anwendung [Reyes et al. 2001]. Zwar kann anhand des Zellbildes unmittelbar nach Dichtegradientenzentrifugation (siehe Abbildung 4, Abschnitt 3.1.1) das Vorkommen mesenchymaler Stammzellen in den Leukapheresaten nicht ausgeschlossen werden, da zumindest morphologisch ähnliche Zellen sichtbar sind. Diese wuchsen aber nicht an und darüber hinaus konnte auch in der nach magnetischer Zellsortierung angelegten Kultur kein Wachstum beobachtet werden. Die Ergebnisse bestätigen die in Abschnitt 1.4.3 bereits vorgestellte Arbeit von Lazarus [Lazarus et al. 1997] und scheinen den Arbeiten zu widersprechen, in denen sich Hinweise auf das Vorkommen mesenchymaler Stammzellen im peripheren Blut finden [Zvaifler et al. 2000, Kocher et al. 2001, Conrad et al. 2002]. Eine Erklärung dieser unterschiedlichen Befunde könnte darin bestehen, dass die Zellen im Prozess der Leukapherese nicht mit angereichert werden beziehungsweise den Prozess nicht überleben. Da Versuche in der eigenen Arbeitsgruppe [Brendel, C (2005): Publikation in Vorbereitung] gezeigt haben, dass mesenchymale Stammzellen in Kulturbeutelmaterial ähnlich gute Wachstums- und Proliferationseigenschaften aufweisen wie in Zellkulturflaschen, könnte auch ein frühes Adhären der Zellen innerhalb des Apheresatbeutels für die erfolglose Isolation der Zellen verantwortlich sein. Dagegen spricht zumindest, dass die Zellen aus den zur Positivkontrolle eingesetzten Knochenmarkbeuteln problemlos gewonnen werden konnten. Zur endgültigen Klärung dieser Fragen wären noch weiterführende Untersuchungen notwendig.

Im weiteren Verlauf der Studie sollte nun ergründet werden, ob sich mesenchymale Stammzellen des Spenders einige Zeit nach der Transplantation im Knochenmark des Empfängers nachweisen lassen. Um zu erfassen, ob ein eventuell auftretendes Engraftment der Spenderzellen vom zeitlichen Abstand zur Transplantation beeinflusst wird, wurden sowohl kurze als auch längere Zeitabstände nach Transplantation gewählt. Ebenso konnte der longitudinale Verlauf einiger Proben (siehe Tabelle 4, Abschnitt 3.3.1) hierzu Anhaltspunkte liefern.

In Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Ergebnissen zur Übertragung der Zellen konnten nach peripherer Blutstammzelltransplantation keine mesenchymalen Stammzellen des Spenders im Empfänger Knochenmark detektiert werden (siehe Abschnitt 3.3.1). Erstaunlicherweise gelang dies jedoch auch nach Knochenmarktransplantation nicht (siehe Abschnitt 3.3.2), obwohl die Zellen hier sicher übertragen wurden und alle Stammzellempfänger zum jeweils gleichen Zeitpunkt ein stabiles Engraftment hämatopoetischer Zellen aufwiesen. In Abschnitt 1.4.3 wurden verschiedene Arbeiten vorgestellt, die zeigen konnten, dass sich *in vitro* expandierte und systemisch infundierte, allogene mesenchymale Stammzellen einige Zeit nach der Verabreichung im Knochenmark des Empfängerorganismus nachweisen lassen [Mosca et al. 2000, Devine et al. 2001, Gao et al. 2001, Horwitz et al. 2002]. Dies legt dar, dass die dauerhafte Ansiedlung der Spenderzellen im Empfänger Knochenmark prinzipiell möglich ist, jedoch an eine größere Zahl transplanteder Zellen gebunden sein könnte. Somit wäre das fehlende Anwachsen der Spenderzellen auch im Rahmen der Knochenmarktransplantation vor allem ein Problem der zu geringen Anzahl übertragener Zellen. Ab welcher Menge eine Transplantation mesenchymaler Stammzellen biologisch relevant ist und zu einer Ansiedlung der Zellen im Empfänger Knochenmark führt, bleibt aber fraglich. Eine andere Interpretation der Ergebnisse könnte darin bestehen, dass die Art der durchgeführten Konditionierung vor Transplantation (siehe Abschnitt 1.2) nicht geeignet war, die mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark des Empfängers in dem Maße abzutöten, wie es für die Ansiedlung der Spenderzellen nötig war. Jedoch stellt sich der Anteil der Spenderzellen sowohl nach reduzierter als auch nach voller Konditionierungsstrategie gleich dar (siehe Tabelle 4 und 5, Abschnitte 3.3.1 und 3.3.2). Somit scheint die Art der Konditionierung das Engraftment der Zellen kaum zu beeinflussen. Vor dem Hintergrund der Befunde muss desweiteren hinterfragt werden, ob mit der durchgeführten Knochenmarkaspiration zur Probengewinnung eine Anzucht der mesenchymalen Stammzellen möglich war, welche die tatsächlichen Mengenverhältnisse von Empfänger- und Spenderzellen im Knochenmark der Patienten widerspiegelt. Da die Zellen adhärent sind und durch eine einfache Aspiration initial nur relativ wenige Zellen gewonnen werden, bleibt die Frage offen, inwieweit eine Knochenmarkbiopsie zur Probengewinnung, wie sie beispielsweise nach der Methode von

Jamshidi durchgeführt wird [Jamshidi und Swaim 1971], einen höheren Spenderzellanteil erbracht hätte. Dem widerspricht zumindest, dass auch bei größeren Zellzahlen, die aus den Aspiraten isoliert werden konnten (siehe Abschnitt 3.1.2), im Vergleich zu den kleineren Zellzahlen keine Unterschiede in den Ergebnissen sichtbar waren. Die Frage würde jedoch nur durch vergleichende Untersuchungen an Zellen, welche aus Knochenmarkaspiration- und biopsie gewonnen wurden, zu klären sein. Auch unter Berücksichtigung der Sensitivität der durchgeführten Mikrosatellitenanalyse von 95 Prozent (siehe Abschnitt 1.3) kann letztlich nicht ausgeschlossen werden, dass sich trotz der eindeutigen Ergebnisse geringe Mengen mesenchymaler Stammzellen des Spenders im Empfänger Knochenmark angesiedelt haben und hier nicht nachgewiesen wurden. Die bei zwei Patienten detektierten minimalen Spendersignale (siehe Tabelle 4, Abschnitt 3.3.1) könnten in diesem Zusammenhang auf ein geringes Engraftment hinweisen.

Die Isolation der mesenchymalen Stammzellen aus den Knochenmarkaspiraten sowie ihre Expansion in der Zellkultur gelang bei 27 der 34 bearbeiteten Proben (siehe Abschnitt 3.1.2). Die Ursache für das mangelhafte Anwachsen der restlichen sieben Proben lag zum einen in der zu geringen Zahl der durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Zellen, zum anderen waren bakterielle Kontaminationen verantwortlich, die im Rahmen der Zellkultur auftraten. Bei den 27 erfolgreich angezüchteten Proben verliefen Isolation und Kultivierung der Zellen unproblematisch mit Ausnahme der in Abschnitt 3.1.2 bereits erwähnten Probe Nr. 2. Hier ließ sich zwar eine geringe Anzahl mesenchymaler Stammzellen aus dem Aspirat isolieren, jedoch vermehrten sich diese unter den gegebenen Kulturbedingungen nicht, wobei das Nährmedium sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch normal war und es keinen Anhalt für eine durch Mikroorganismen verursachte Kontamination gab. Obwohl die extrahierte DNS-Menge für die Darstellung des β -Interferon-Gens nicht ausreichte (siehe Abschnitt 3.2.2), konnte die Mikrosatellitenanalyse problemlos durchgeführt werden. Im Zusammenhang mit den in der Arbeit angewandten Isolations- und Kultivierungsmethoden besteht ein wichtiger kritischer Ansatzpunkt in der Frage, inwiefern es sich bei den Zellen tatsächlich um mesenchymale Stammzellen und nicht um andere adhärente Zelltypen des Knochenmarkstromas beziehungsweise der mononukleären Zellfraktion handelt. Diesbezüglich existieren aus der eigenen Arbeitsgruppe Vorarbeiten, welche sowohl die phänotypische Charakterisierung (siehe Abbildung 9, Abschnitt 3.1.2) als auch die osteogene, chondrogene und adipogene in-vitro-Differenzierungsfähigkeit der Zellen aufzeigen [Brendel et al. 2005]. Hierbei erfüllen die von uns kultivierten Zellen bei gegebener Isolationsmethode die Charakteristika mesenchymaler Stammzellen (siehe Abschnitt 1.4.1) und zeigen darüber hinaus in der Zellkultur sowie in allen wiederholt durchgeführten FACS-Analysen einen

hohen Reinheitsgrad, welcher sich letztendlich auch makroskopisch in der Homogenität der Zellpopulation widerspiegelt (siehe Abbildungen 5-8, Abschnitt 3.1.2).

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten stimmen nicht mit den in Abschnitt 1.4.3 bereits vorgestellten Ergebnissen von Keating [Keating et al. 1982] überein, sondern untermauern vielmehr die Resultate von Simmons [Simmons et al. 1987]. Eine mögliche Erklärung dieser widersprüchlichen Befunde ergibt sich bei der Betrachtung der Methoden, mit welchen die Knochenmarkstromazellen in den jeweiligen Arbeiten isoliert und charakterisiert wurden. Sowohl bei Simmons als auch bei Keating bestanden die Stromazellkulturen aus Fibrozyten, Adipozyten und adhärennten Makrophagen. Nur Simmons aber unterschied in seiner Analyse durch eine spezifische Anfärbung die Makrophagen als Zellen hämatopoetischen Ursprungs von den übrigen genannten Zellarten. Entsprechend dieser Einteilung identifizierte er die Makrophagen als Spenderzellen, während die Stromazellen vom Empfänger stammten. Bei Keating flossen die Makrophagen in die Gesamtanalyse mit ein und könnten somit eine Erklärung für die gegensätzliche Datenlage sein. Desweiteren unterscheiden sich die Arbeiten von Simmons und Keating in der Sensitivität der zur Bestimmung des Spenderchimärismus verwendeten Methoden. Keating beschreibt die Sensitivität der von ihm durchgeführten Detektion des Y-Chromatins mit 66 Prozent, während Simmons für die in seiner Arbeit verwendete in-situ-Hybridisierung eine Sensitivität von 100 Prozent angibt. Unter Einbeziehung anderer Arbeiten, die ebenfalls bereits in Abschnitt 1.4.3 erwähnt wurden, bleiben die Befunde widersprüchlich. Zwar konnten Stromazellen des Spenders [Cilloni et al. 2000] beziehungsweise bei einzelnen Patienten auch mesenchymale Stammzellen des Spenders [Villaron et al. 2004] nach Transplantation im Empfängerknochenmark nachgewiesen werden. In anderen Arbeiten aber wurden Stromazellen [Laver et al. 1987, Agematsu und Nakahori 1991] und mesenchymale Stammzellen [Koc et al. 1999, Hongeng et al. 2001] nach Transplantation als Empfängerzellen charakterisiert. Die bei den erwähnten Arbeiten verwendeten Methoden zur Bestimmung des Spenderzellanteils waren die PCR des Androgenrezeptorgens sowie des Amelogenin-Gens [Cilloni et al. 2000], die Mikrosatellitenanalyse [Agematsu und Nakahori 1991, Hongeng et al. 2001, Villaron et al. 2004], die Karyotypisierung [Laver et al. 1987] und die in-situ-Hybridisierung [Agematsu und Nakahori 1991, Koc et al. 1999]. In der vorliegenden Arbeit kam die Methode der Mikrosatellitenanalyse zur Anwendung, da sie wie in Abschnitt 1.3 dargestellt nicht auf eine verschieden geschlechtliche Spender-/Empfängerkonstellation angewiesen ist und zudem eine ähnlich hohe Sensitivität aufweist wie die in-situ-Hybridisierung [Thiede et. al 1999].

In Anbetracht der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bleibt die Rolle der mesenchymalen Stammzellen des Spenders im Rahmen einer Blutstammzelltransplantation fraglich. Es

scheint in diesem Zusammenhang noch am ehesten möglich, dass die bei der Knochenmarktransplantation mit übertragenen Zellen immunologisch bedeutsam sein könnten. So finden sich Hinweise dafür, dass nach einer Knochenmarktransplantation insgesamt weniger und leichter verlaufende Fälle von Graft-versus-Host-Disease auftreten als nach einer allogenen peripheren Blutstammzelltransplantation [Cutler et al. 2001, Barge et al. 2001, Flowers et al. 2002]. Inwieweit hierfür jedoch die mesenchymalen Stammzellen des Spenders verantwortlich sind, bleibt spekulativ. In Abschnitt 1.4.2 wurden bereits Arbeiten vorgestellt, die den Einfluss mesenchymaler Stammzellen auf immunologische Vorgänge beziehungsweise die Lymphozytenfunktion aufzeigen [Li et al. 2000, Bartholomew et al. 2002, Di Nicola et al. 2002, Rasmusson et al. 2003, Le Blanc et al. 2003, 2004]. Die Untersuchungen legen dabei aber auch die Vermutung nahe, dass die Unterdrückung der lymphozytären Immunantwort zumindest in vitro an eine größere Zahl mesenchymaler Stammzellen gebunden ist [Le Blanc et al. 2003]. Dies stellt ihre Bedeutsamkeit unter Berücksichtigung der vorliegenden Ergebnisse wiederum in Frage. Möchte man im Rahmen von Blutstammzelltransplantationen zukünftig von den mesenchymalen Stammzellen des Spenders profitieren, scheint die in Abschnitt 1.4.2 dargestellte Möglichkeit der allogenen Transplantation von ex vivo expandierten Zellen [Koc et al. 2002] sehr vielversprechend zu sein. Die Frage, ob sich nach einer Blutstammzelltransplantation das Engraftment der hämatopoetischen Zellen oder eventuelle Abstoßungs- und Toleranzmechanismen durch kotransplantierte mesenchymale Stammzellen positiv beeinflussen lassen, ist derzeit Gegenstand weiterer Forschung.

5 Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen sind bindegewebige Vorläuferzellen, die sich als Bestandteile des adulten Knochenmarkstromas aus dem Knochenmark isolieren und unter geeigneten Kulturbedingungen ex vivo expandieren lassen. Die Zellen sind in der Lage, sich durch Teilung selbst zu erhalten und verschiedenartig differenzierte Tochterzellen hervorzubringen, so zum Beispiel Osteozyten, Chondrozyten, Myozyten, Fibrozyten und Adipozyten. Die Frage, ob mesenchymale Stammzellen im Rahmen einer allogenen Blutstammzelltransplantation mit übertragen werden, konnte bisher nicht zufriedenstellend beantwortet werden. Ebenso ist im Falle einer Übertragung das Schicksal der Spenderzellen im Empfängerorganismus unklar.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst ergründet werden, ob mesenchymale Stammzellen im Rahmen einer allogenen peripheren Blutstammzelltransplantation mit übertragen werden. Dazu wurden Leukapheresate von Spendern nach peripherer Blutstammzelltransplantation im Vergleich zu Knochenmark von Spendern nach Knochenmarktransplantation untersucht. Desweiteren sollten bei Empfängern allogener peripherer Blutstammzelltransplantationen und allogener Knochenmarktransplantationen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transplantation mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark isoliert werden, um bei diesen den vom Blutstammzellspender stammenden Mengenanteil zu ermitteln.

Um mesenchymale Stammzellen aus Leukapheresaten zu isolieren, erfolgte zuerst eine Dichtegradientenzentrifugation, der sich entweder die unmittelbare Zellkultur oder die Kultivierung nach weiterer Auftrennung durch magnetische Zellsortierung anschloss. Zur Isolation der mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark wurden Knochenmarkaspirate von Empfängern nach Blutstammzelltransplantation zunächst ebenfalls mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und im Anschluss die daraus gewonnene mononukleäre Zellfraktion kultiviert, wobei die mesenchymalen Stammzellen durch die Wahl der Kulturbedingungen selektioniert und expandiert wurden. Aus den Zellen wurde dann die genomische DNS extrahiert und durch Mikrosatellitenanalyse der Spenderzellanteil ermittelt.

Es wurden Leukapheresate von neun Spendern sowie Knochenmark von zwei Spendern nach Transplantation bearbeitet. Aus den Leukapheresaten konnten mit den verwendeten Methoden keine mesenchymalen Stammzellen isoliert und angezüchtet werden. Dagegen gelang dies aus dem Knochenmark problemlos. Bei den Empfängern allogener Blutstammzelltransplantationen wurden Knochenmarkaspirate von 34 Patienten

aufgearbeitet, wobei die Anzucht der mesenchymalen Stammzellen bei Aspiraten von 27 Patienten, die zwischen 25 und 1334 Tagen nach Transplantation gewonnen wurden, erfolgreich war. Von den 27 Proben stammen 18 von Empfängern nach peripherer Blutstammzelltransplantation und neun von Empfängern nach Knochenmarktransplantation. Bei vier der Patienten nach peripherer Blutstammzelltransplantation war durch Mehrfachanalysen die Darstellung eines intraindividuellen Verlaufs möglich. Die Mikrosatellitenanalyse ergab in fast allen untersuchten Fällen einen Spenderanteil von null Prozent. Lediglich in zwei Proben nach peripherer Blutstammzelltransplantation wurden schwache Spendersignale detektiert, deren Anteil aber unter fünf Prozent betrug.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass mesenchymale Stammzellen bei der allogenen Knochenmarktransplantation mit übertragen werden, während im Rahmen der allogenen peripheren Blutstammzelltransplantation ihre Übertragung nicht gezeigt werden konnte. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach allogener Blutstammzelltransplantation waren weder im Falle der Knochenmarktransplantation noch bei der peripheren Blutstammzelltransplantation mesenchymale Stammzellen des Spenders im Knochenmark des Empfängers nachweisbar, während die Blutzellen zum jeweils gleichen Zeitpunkt ein Spenderprofil aufwiesen.

Die klinische Bedeutsamkeit der mesenchymalen Stammzellen des Spenders im Rahmen einer Blutstammzelltransplantation ist vor dem Hintergrund der Ergebnisse fraglich. Die Zellen, die während einer Knochenmarktransplantation mit übertragen werden, könnten immunologisch bedeutungsvoll sein, so beispielsweise im Zusammenhang mit dem im Vergleich zur peripheren Blutstammzelltransplantation verminderten Auftreten der Graft-versus-Host-Disease.

6 Literaturverzeichnis

Agematsu K., Nakahori Y. (1991): Recipient origin of bone marrow-derived fibroblastic stromal cells during all periods following bone marrow transplantation in humans. *Br J Haematol*, 1991 Nov;79(3):359-65

Alison M., Sarraf C. (1998): Hepatic stem cells. *J Hepatol*, 1998 Oct;29(4):676-82

Almeida-Porada G., Shabrawy D.E., Porada C., Zanjani E.D. (2002): Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. *Exp Hematol*, 2002 30:1454-62

Anklesaria P., Kase K., Glowacki J., Holland C.A., Sakakeeny M.A., Wright J.A., Fitzgerald T.J., Lee C.Y., Greenberger J.S. (1987): Engraftment of a clonal bone marrow stromal cell line in vivo stimulates hematopoietic recovery from total body irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987 Nov;84(21):7681-5

Barge R.M., Brower R.E., Beersma M.F., Starrenburg C.W., Zwinderman A.H., Hale G., Waldmann H., den Ottolander G.J., Falkenburg J.H., Willemze R., Fibbe W.E. (2001): Comparison of allogeneic T cell-depleted peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation: effect of stem cell source on short- and long-term outcome. *Bone Marrow Transplant*, 2001 May;27(10):1053-8

Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M., Ferrer K., McIntosh K., Patil S., Hardy W., Devine S., Ucker D., Deans R., Moseley A., Hoffman R. (2002): Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*, 2002 Jan;30(1):42-8

Bensinger W., Singer J., Appelbaum F., Lilleby K., Longin K., Rowley S., Clarke E., Clift R., Hansen J., Shields T., Storb R., Weaver C., Weiden P., Buckner C.D. (1993): Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. *Blood*, 1993 Jun 1;81(11):3158-63

Bjornson C.R., Rietze R.L., Reynolds B.A., Magli M.C., Vescovi A.L. (1999): Turning Brain into Blood: A Hematopoietic Fate Adopted by Adult Neural Stem Cells in Vivo. *Science*, 1999 Jan;283:534-37

Brendel C., Kuklick L., Hartmann O., Kim T.D., Boudriot U., Schwell D., Neubauer A. (2005): Distinct gene expression profile of human mesenchymal stem cells in comparison to skin fibroblasts employing cDNA microarray analysis of 9600 genes. *Gene Expression*, zur Publikation angenommen

Bruder S.P., Jaiswal N., Haynesworth S.E. (1997): Growth Kinetics, Self-Renewal, and the Osteogenic Potential of Purified Human Mesenchymal Stem Cells During Extensive Subcultivation and Following Cryopreservation. *J Cell Biochem*, 1997 64:278-294

Bruder S.P., Kurth A.A., Shea M., Hayes W.C., Jaiswal N., Kadiyala S. (1998): Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 1998 Mar;16(2):155-62

Caplan A.I. (1991): Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res*, 1991 Sep;9(5):641-50

Caplan A.I. (1994): The mesengenic process. *Clin Plast Surg*, 1994 Jul;21(3):429-35

Cassiede P., Dennis J.E., Ma F., Caplan A.I. (1996): Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cells exposed to TGF-beta 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res*, 1996 Sep;11(9):1264-73

Cheng L., Qasba P., Vanguri P., Thiede M.A. (2000): Human Mesenchymal Stem Cells Support Megakaryocyte and Pro-Platelet Formation From CD34⁺ Hematopoietic Progenitor Cells. *J Cell Physiol*, 2000 184:58-69

Chien A., Edgar D.B., Trela J.M. (1976): Desoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol*, 1976 Sep; 127(3):1550-7

Cilloni D., Carlo-Stella C., Falzetti F., Sammarelli G., Regazzi E., Colla S., Rizzoli V., Aversa F., Martelli M.F., Tabilio A. (2000): Limited engraftment capacity of bone marrow-derived mesenchymal cells following T-cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2000 Nov; 96:3637-3643

Clark J.M. (1988): Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, 1988 Oct 25;16(20):9677-86

Conrad C., Gottgens B., Kinston S., Ellwart J., Huss R. (2002): GATA transcription in a small rhodamine 123^{low}CD34⁺ subpopulation of a peripheral blood-derived CD34⁺CD105⁺ mesenchymal cell line. *Exp Hematol*, 2002 30:887-895

Cutler C., Giri S., Jeyapalan S., Paniagua D., Viswanathan A., Antin J.H. (2001): Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. *J Clin Oncol*, 2001 Aug 15;19(16):3685-91

Dennis J.E., Caplan A.I. (1996): Analysis of the developmental potential of conditionally immortal marrow-derived mesenchymal progenitor cells isolated from the H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Connect Tissue Res*, 1996 35(1-4):93-9

Devine S.M., Hoffman R. (2000): Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol*, 2000 Nov;7(6):358-63

Devine S.M., Bartholomew A.M., Mahmud N., Nelson M., Patil S., Hardy W., Sturgeon C., Hewett T., Chung T., Stock W., Sher D., Weissman S., Ferrer K., Mosca J., Deans R., Moseley A., Hoffman R. (2001): Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol*, 2001 Feb;29(2):244-55

Dexter T.M., Allen T.D., Lajtha L.G. (1977): Conditions Controlling the Proliferation of Haemopoietic Stem Cells In Vitro. *J Cell Physiol*, 1977 91:335-44

Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., Milanesi M., Longoni P.D., Matteucci P., Grisanti S., Gianni A.M. (2002): Human bone marrow stromal cells suppress T-Lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 2002 15;99(10):3838-43

Ebeling W., Hennrich N., Klockow M., Metz H., Orth H.D., Lang H. (1974): Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *Eur J Biochem*, 1974 Aug 15;47(1):91-7

Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavillo F. (1998): Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors. *Science*, 1998 279:1528

Flowers M.E., Parker P.M., Johnston L.J., Matos A.V., Storer B., Bensinger W.I., Storb R., Appelbaum F.R., Forman S.J., Blume K.G., Martin P.J. (2002): Comparison of chronic graft-versus-host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood*, 2002 Jul 15;100(2):415-9

Freund M., Queisser W. (1991): Knochenmarkpunktion. In: Ostendorf P.C. (Hrsg.): Band 8 Hämatologie. Gerok W., Hartmann F., Schuster H.P. (Reihen-Hrsg.): Innere Medizin der Gegenwart. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore

Friedenstein A.J., Gorskaja J.F., Kulagina N.N. (1976): Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 1976 Sep;4(5):267-74

Gage F.H. (2000): Mammalian neural stem cells. *Science*, Feb 25;287(5457):1433-8

Galotto M., Berisso G., Delfino L., Podesta M., Ottaggio L., Dallorso S., Dufour C., Ferrara G.B., Abbondandolo A., Dini G., Bacigalupo A., Cancedda R., Quarto R. (1999): Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol*, 1999 Sep;27(9):1460-6

Gao J., Dennis J.E., Muzic R.F., Lundberg M., Caplan A.I. (2001): The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*, 2001; 169(1):12-20

Georges G.E., Storb R. (2003): Review of minitransplantation: nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*, 2003 Jan;77(1):3-14

Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I. (1996): Cytokine expression by human marrow-derived progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol*, 1996 Mar;166(3):585-92

Holt C.L., Buoncristiani M., Wallin J.M., Nguyen T., Lazaruk K.D., Walsh P.S. (2002): TWGDAM validation of AmpFISTR PCR amplification kits for forensic DNA casework. *J Forensic Sci*, 2002 Jan;47(1):66-96

Hongeng S., Petvises S., Rerkamnuaychoke B., Worapongpaiboon S., Tardtong P., Apibal S., Ungkanont A. (2001): Host Origin of Marrow Mesenchymal Stem Cells Following Allogeneic Cord-Blood Stem-Cell Transplantation. *Int J Hematol*, 2001 74:235-36

Horwitz E.M., Gordon P.L., Koo W.K., Marx J.C., Neel M.D., McNall R.Y., Muul L., Hofmann T. (2002): Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002 Jun;99(13):8932-37

Ikpeazu C., Davidson M.K., Halteman D., Browning P.J., Brandt S.J. (2000): Donor origin of circulating endothelial progenitors after allogeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2000 6(3A):301-8

Jackson K.A., Mi T., Goodell M.A. (1999): Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999 Dec;96(25):14482-486

Jaiswal R.K., Jaiswal N., Bruder S.P., Mbalaviele G., Marshak D.R., Pittenger M.F. (2000): Adult Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation to the Osteogenic or Adipogenic Lineage Is Regulated by Mitogen-activated Protein Kinase. *J Biol Chem*, 2000 275:9645-9652

Jamshidi K., Swaim W.R. (1971): Bone marrow biopsy with unaltered architecture: a new biopsy device. *J Lab Clin Med*, 1971 Feb;77(2):335-42

Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M. (2002): Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002 Jul;418(6893):41-9

Kadiyala S., Young R.G., Thiede M.A., Bruder S.P. (1997): Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant*, 1997 Mar-Apr;6(2):125-34

Keating A., Singer J.W., Killen P.D., Striker G.E., Salo A.C., Sanders J., Thomas E.D., Thorning D., Fialkow P.J. (1982): Donor origin of the in vitro haematopoietic microenvironment after marrow transplantation in man. *Nature*, 1982 Jul;298:280-83

Koc O.N., Peters C., Aubourg P., Raghavan S., Dyhouse S., DeGasperi R., Kolodny E.H., Yoseph Y.B., Gerson S.L., Lazarus H.M., Caplan A.I., Watkins P.A., Krivit W. (1999): Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Exp Hematol*, 1999 Nov;27(11):1675-81

Koc O.N., Gerson S.L., Cooper B.W., Dyhouse S.M., Haynesworth S.E., Caplan A.I., Lazarus H.M. (2000): Rapid Hematopoietic Recovery After Coinfusion of Autologous-Blood Stem Cells and Culture-Expanded Marrow Mesenchymal Stem Cells in Advanced Breast Cancer Patients Receiving High-Dose Chemotherapy. *J Clin Oncol*, 2000 Jan;18:307-16

Koc O.N., Day J., Nieder M., Gerson S.L., Lazarus H.M., Krivit W. (2002): Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant*, 2002 30:215-22

Kocher A.A., Schuster M.D., Szabolcs M.J., Takuma S., Burkhoff D., Wang J., Homma S., Edwards N.M., Itescu S. (2001): Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*, 2001 Apr;7(4):430-36

Kolbe K., Heimpel H. (2000): Substitution und Transplantation von Blutzellen. In: Gerok W., Huber C., Meinertz T., Zeidler H. (Hrsg.): Die Innere Medizin, 10. Auflage. Schattauer, Stuttgart, New York

Kopen G.C., Prockop D.J., Phinney D.G. (1999): Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999 Sep 14;96(19):10711-6

Kushida T., Inaba M., Hisha H., Ichioka N., Esumi T., Ogawa R., Iida H., Ikehara S. (2001): Crucial Role of Donor-Derived Stromal Cells in Successful Treatment for Intractable Autoimmune Diseases in MRL/lpr Mice by BMT Via Portal Vein. *Stem Cells*, 2001 19:226-35

Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L., Wang X., Finegold M., Weissman I.L., Grompe M. (2000): Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.*, 2000 Nov;6(11):1212-3

Laver J., Jhanwar S.C., O'Reilly R.J., Castro-Malaspina H. (1987): Host origin of the human hematopoietic microenvironment following allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 1987 Dec;70(6):1966-8

Lawler M., Humphries P., McCann S.R. (1991): Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction. *Blood*, Jun 1;77(11):2504-14

Lazarus H.M., Haynesworth S.E., Gerson S.L., Rosenthal N.S., Caplan A.I. (1995): Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant*, 1995 Oct;16(4):557-64

Lazarus H.M., Haynesworth S.E., Gerson S.L., Caplan A.I. (1997): Human bone marrow-derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections. *J Hematother*, 1997 Oct;6(5):447-55

Le Blanc K., Tammik L., Sundberg B., Haynesworth S.E., Ringden O. (2003): Mesenchymal Stem Cells Inhibit and Stimulate Mixed Lymphocyte Cultures and Mitogenic Responses Independently of the Major Histocompatibility Complex. *Scand J Immunol*, 2003 Jan;57(1):11-20

Le Blanc K., Rasmusson I., Sundberg B., Gotherstrom C., Hassan M., Uzunel M., Ringden O. (2004): Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, 2004 1;363(9419):1439-41

Li Y., Hisha H., Inaba M., Lian Z., Yu C., Kawamura M., Yamamoto Y., Nishio N., Toki J., Fan H., Ikehara S. (2000): Evidence for migration of donor bone marrow stromal cells into recipient thymus after bone marrow transplantation plus bone grafts: A role of stromal cells in positive selection. *Exp Hematol*, 2000 28:950-60

Liechty K.W., Mac Kenzie T.C., Shabaan A.F., Radu A., Moseley A.B., Deans R., Marshak D.R., Flake A.W. (2000): Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*, 2000 Nov;6(11):1282-6

Majumdar M.K., Thiede M.A., Mosca J.D., Moorman M., Gerson S.L. (1998): Phenotypic and Functional Comparison of Cultures of Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Stromal Cells. *J Cell Physiol*, 1998 176:57-66

Majumdar M.K., Thiede M.A., Haynesworth S.E., Bruder S.P., Gerson S.L. (2000): Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res*, 2000 Dec;9(6):841-8

Mosca J.D., Hendricks J.K., Buyaner D., Davis-Sproul J., Chuang L.C., Majumdar M.K., Chopra R., Barry F., Murphy M., Thiede M.A., Junker U., Rigg R.J., Forestell S.P., Bohnlein E., Storb R., Sandmaier B.M. (2000): Mesenchymal Stem Cells as vehicles for gene delivery. *Clin Orthop*, 2000 Oct;(379 Suppl):S71-90

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*, 1992;24:17-27

Ohgushi H., Goldberg V.M., Caplan A.I. (1989): Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand*, 1989 Jun;60(3):334-9

Osgood E.E., Riddle M.C., Mathews T.J.(1939): Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow: Case report. *Ann Intern Med*, 1939 13:357

Ostendorf P.C. (1991): Knochenmarktransplantation. In: Ostendorf P.C. (Hrsg.): Band 8 Hämatologie. Gerok W., Hartmann F., Schuster H.P. (Reihen-Hrsg.): Innere Medizin der Gegenwart. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore

Perkins S., Fleischman R. (1988): Hematopoietic microenvironment. Origin, lineage, and transplantability of the stromal cells in long-term bone marrow cultures from chimeric mice. *J Clin Invest*, 1988 81:1072-80

Piersma A.H., Ploemacher R.E., Brockbank K.G.M. (1983): Transplantation of bone marrow fibroblastoid stromal cells in mice via the intravenous route. *Br J Hematol*, 1983 54:285-90

Pittenger M.F., Alastair M.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. (1999): Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 1999 284:143

Pittenger M.F., Mosca J.D., McIntosh K.R. (2000): Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2000 251:3-11

Pittenger M.F., Marshak D.R. (2001): Mesenchymal Stem Cells of Human Adult Bone Marrow. In: Marshak D.R., Gardner R.L., Gottlieb D. (Hrsg.): Stem Cell Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Potten C.S. (1998): Stem Cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1998 Jun 29;353(1370):821-30

Rasmusson I., Ringden O., Sundberg B., Le Blanc K. (2003): Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*, 2003 27;76(8):1208-13

Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C.M. (2001): Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 2001 Nov; 98(9):2615-25

Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology*, 1992;24:476-80

Sata M., Saiura A., Kunisato A., Tojo A., Okada S., Tokuhisa T., Hirai H., Makuuchi M., Hirata Y., Nagai R. (2002): Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*, 2002;8(4):403-9

Schiebler T.H. (1996): Blutbildung. In: Junqueira L.C., Carneiro J. (Hrsg.): Histologie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Schmitz N., Dreger P., Suttorp M., Rohwedder E.B., Haferlach T., Löffler H., Hunter A., Russell N.H. (1995): Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor). *Blood*, 1995 Mar 15;85(6):1666-72

Schmitz N., Linch D.C., Dreger P., Goldstone A.H., Boogaerts M.A., Ferrant A., Demuyneck H.M., Link H., Zander A., Barge A. (1996): Randomised trial of filgrastim-mobilized peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients. *Lancet*, 1996 Feb 10;347(8998):353-7

Sheridan W.P., Begley C.G., Juttner C.A., Szer J., To L.B., Maher D., McGrath K.M., Morstyn G., Fox R.M. (1992): Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Lancet*, 1992 Mar 14;339(8794):640-4

Simmons P.J., Przepiorka D., Thomas E.D., Torok-Storb B. (1987): Host origin of marrow stromal cells following allogeneic bone marrow transplantation. *Nature*, 1987 Jul;328:429-32

Thiede C., Florek M., Bornhäuser M., Ritter M., Mohr B., Brendel C., Ehninger G., Neubauer A. (1999): Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant*, 1999 May;23(10):1055-60

Thiede C., Bornhäuser M., Oelschlägel U., Brendel C., Leo R., Daxberger H., Mohr B., Florek M., Kroschinsky F., Geissler G., Naumann R., Ritter M., Prange-Krex G., Lion T., Neubauer A., Ehninger G. (2001): Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia*, 2001 Feb;15(2):293-302

Thomas E.D., Storb R., Fefer A., Slichter S.J., Bryant J.I., Buckner C.D., Neiman P.E., Clift R.A., Funk D.D., Lerner K.E. (1972): Aplastic anaemia treated by marrow transplantation. *Lancet*, 1972 Feb 5;1(7745):284-9

Thomas E.D., Buckner C.D., Banaji M., Clift R.A., Fefer A., Flournoy N., Goodell B.W., Hickman R.O., Lerner K.G., Neiman P.E., Sale G.E., Sanders J.E., Singer J., Stevens M., Storb R., Weiden P.L. (1977): One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation and allogeneic marrow transplantation. *Blood*, 1977 Apr;49(4):511-33

Thomas E.D., Buckner C.D., Clift R.A., Fefer A., Johnson F.L., Neiman P.E., Sale G.E., Sanders J.E., Singer J.W., Shulman H., Storb R., Weiden P.L. (1979): Marrow transplantation for acute non-lymphoblastic leukemia in first remission. *N Engl J Med*, 1979 Sep 13;301(11):597-9

Thomas E.D. (1995): Knochenmarktransplantation. In: Schmailzl K. (Hrsg.): *Harrisons Innere Medizin*, Band 2, 13. Auflage. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, Wien

Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S., Byrne B.J., Kessler P.D. (2002): Human Mesenchymal Stem Cells Differentiate to a Cardiomyocyte Phenotype in the Adult Murine Heart. *Circulation*, 2002 Jan, 105(1):93-98

Ugozzoli L., Yam P., Petz L.D., Ferrara G.B., Champlin R.E., Forman S.J., Koyal D., Wallace R.B. (1991): Amplification by the polymerase chain reaction of hypervariable regions of the human genome for evaluation of chimerism after bone marrow transplantation. *Blood*, 1991 Apr 1;77(7):1607-15

Villaron E.M., Almeida J., Lopez-Holgado N., Alcoceba M., Sanchez-Abarca L.I., Sanchez-Guijo F.M., Alberca M., Perez-Simon J.A., San Miguel J.F., Del Canizo M.C. (2004): Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*, 2004 Dec;89(12):1421-7

Wakitani S., Goto T., Pineda S.J., Young R.G., Mansour J.M., Caplan A.I., Goldberg V.M. (1994): Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am Vol*, 76:579-592

Wakitani S., Saito T., Caplan A.I. (1995): Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, 1995 Dec;18(12):1417-26

Walsh P.S., Fildes N.J., Reynolds R. (1996): Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acid Res*, 1996 Jul 15;24(14):2807-12

Watt F.M. (1998): Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1998 Jun 29;353(1370):831-7

Weissman I.L. (2000): Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*, 2000 Feb 25;287(5457):1442-6

Wessman M., Ruutu T., Volin L., Knuutila S. (1989): In situ hybridization using a Y-specific probe – a sensitive method for distinguishing residual male recipient cells from female donor cells in bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 1989 May;4(3):283-6

Yam P.Y., Petz L.D., Knowlton R.G., Wallace R.B., Stock A.D., de Lange G., Brown V.A., Donis-Keller H., Blume K.G. (1987): Use of DNA restriction fragment length polymorphisms to document marrow engraftment and mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation. *Transplantation*, 1987 Mar;43(3):399-407

Young R.G., Butler D.L., Weber W., Caplan A.I., Gordon S.L., Fink D.J. (1998): Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for achilles tendon repair. *J Orthop Res*, 1998 Jul 16;406-13

Zvaifler N.J., Marinova-Mutafchieva L., Adams G., Edwards C.J., Moss J., Burger J.A., Maini R.N. (2000): Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*, 2000 2(6):477-88

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

in Rostock: Beck, Börner, Brock, Gerber, Jonas, Meyer-Probst, Noack, Pfeiffer, Richter, Roether, Rückborn, Ulfig, Vogel, Walzel, Wree

in Marburg: Arnold, Barth, Barth, Baum, Becker, Beyer, Christiansen, Czubayko, Geks, Gotzen, Griss, Gudermann, Happle, Hellinger, Hesse, Heufelder, Höffken, Hofmann, Joseph, Jungclas, Kälble, Klenk, Klose, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhn, Lange, Lippert, Löw, Maisch, Moll, Müller, Muffers, Neubauer, Oertel, Remschmidt, Renz, Riße, Rothmund, Schäfer, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schneider, Schüffel, Seyberth, Töllner, Weiler, Werner, Wolf, Wulf

in München: Bartels, Blobner, Brauer, Bumm, Dirschinger, Duyster, Feith, Gawatz, Gumppenberg von, Hautmann, Hundelshausen von, Jelen-Esselborn, Kochs, Lanzl, Licht, Metak, Nekarda, Ott, Peschel, Scherer, Schmidt, Schneider, Schneller, Schömig, Siewert, Stein, Tempel, Theiss, Vogelsang, Wagner

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Neubauer

Leiter des Zentrums für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie des Universitätsklinikums der Philipps-Universität Marburg für die Annahme und Betreuung der Arbeit sowie für die Bereitstellung der Patientenproben, des Arbeitsplatzes und der Materialien

Frau Dr. med. Cornelia Brendel

aus dem Zentrum für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie des Universitätsklinikums der Philipps-Universität Marburg für die Betreuung, Anleitung und Unterstützung der Arbeit

Herrn Priv. Doz. Dr. med. Jörg Beyer

aus dem Zentrum für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie des Universitätsklinikums der Philipps-Universität Marburg für die Hilfe bei der Bereitstellung der Patientenproben

Herrn Priv. Doz. Dr. med. Rainer Schwerdtfeger

Leiter des Zentrums für Knochenmarktransplantation der Stiftung Deutsche Klinik für Diagnostik in Wiesbaden und seinen Mitarbeitern für die Überlassung der Patientenproben

Herrn Priv. Doz. Dr. med. Christian Thiede

aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus an der Technischen Universität Dresden (Leiter: Herr Prof. Dr. med. G. Ehninger) und seinen Mitarbeitern für die Überlassung der Vorbefunde

Frau Kathleen Stabla, Frau Dagmar Schwell, Frau Jenny Eckhardt, Frau Sarah Fehl sowie Frau Dr. rer. nat. Larissa Kuklick

aus dem Zentrum für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie des Universitätsklinikums der Philipps-Universität Marburg für die praktische Unterstützung und Anleitung bei der Laborarbeit

Frau Ramona Vietzke

aus dem Zentrum für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie des Universitätsklinikums der Philipps-Universität Marburg für die Hilfe bei der Aufarbeitung der Transplantationsdaten